

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**INHIBICIÓN DE *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS CON ENCAPSULADOS
DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE BACTERIOCINAS
Y CARACTERIZACIÓN AL MFA**

POR

MC. FABIOLA LIZETH CUELLAR GUEVARA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

DICIEMBRE, 2019

**Inhibición de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS con encapsulados
de liberación controlada de bacteriocinas y caracterización al MFA**

por

MC. Fabiola Lizeth Cuellar Guevara

Como requisito parcial para obtener el Grado de
Doctor en Ciencias con Orientación en Microbiología

Comité de Tesis

Dra. María Porfiria Barrón González
Director de Tesis

Dr. Ramón Gerardo Rodríguez Garza
Secretario

Dra. Patricia Tamez Guerra
Vocal 1

Dra. Licet Villarreal Treviño
Vocal 2

Dra. Zinnia Judith Molina Garza
Vocal 3

Diciembre de 2019

AGRADECIMIENTOS

"La vida no es fácil, para ninguno de nosotros. Pero... ¡qué importa! Hay que perseverar y, sobre todo, tener confianza en uno mismo. Hay que sentirse dotado para realizar alguna cosa y que esa cosa hay que alcanzarla, cueste lo que cueste." (Marie Curie)

Primeramente agradezco a Dios por sobre todas las cosas, por darme la vida y las fuerzas para lograr terminar este sueño que se hizo realidad. Agradezco a la Universidad Autónoma de Nuevo León y a la Facultad de Ciencias Biológicas por estos años en que me han abierto las puertas de sus instalaciones para el desarrollo de esta tesis y de mi desarrollo profesional.

A mis padres, Norma E. Guevara Salazar y Mauro Cuellar Aguirre, quienes a lo largo de mi vida tanto personal como profesional siempre han estado a mi lado apoyándome.

Agradezco en especial a Ricardo Pérez Rodríguez, doy gracias a Dios por tenerte en mi vida. Muchas gracias por tu inmensa paciencia, tu ayuda y apoyo siempre. Por estar allí conmigo en la realización de este proyecto.

Mi agradecimiento a la Dra. María Porfiria Barrón González gracias por abrirme las puertas del laboratorio; por su amistad, ayuda, consejos, paciencia y generosidad. Por todo lo que me ha enseñado e inspirado cada día, le estoy doblemente agradecida.

Un agradecimiento muy especial a:

☞ **Dra. Licet Villarreal Treviño**

☞ **Dra. Zinnia Judith Molina Garza**

☞ **Dra. Patricia Tamez Guerra**

☞ **Dr. Ramón Gerardo Rodríguez Garza**

por su apreciable ayuda incondicional, sus valiosas aportaciones a este trabajo y brindarme siempre su apoyo, consejos y sobre todo su tiempo dedicado a la revisión de diversas tareas referente a este proyecto.

Agradezco al Dr. Jorge Luis Menchaca Arredondo, por brindarme su valiosa amistad, su asesoría y consejos. Por haber aceptado fungir como mi director externo

A todos mis maestros del Departamento de Biología Celular y Genética, UANL. Agradezco a todos mis buenos amigos y compañeros del laboratorio y compañeros de la carrera por permitirme aprender junto a ustedes, con mucho cariño.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca proporcionada durante el desarrollo de este trabajo.

DEDICATORIAS

Mis logros los dedico a las personas que creen en mí... A mi hermosa familia, mi pilar y motor de todo mi esfuerzo realizado. Por enseñarme que el éxito no es el resultado de la casualidad sino del esfuerzo perseverante e incansable.

Mis amados padres, Norma y Mauro, por estar al pie del cañón en todo momento; por levantarme cuando me sentí caída y que ya no podía y alentarme a dar un esfuerzo más. A mis queridos hermanos, Diana y Jesús.

Es tanto mi agradecimiento hacia ustedes que una hoja no basta. Gracias porque siempre me dieron y me siguen dando su apoyo y amor incondicional y por estar conmigo en las buenas y en las malas. Gracias porque siempre creyeron en mí y no los defraudé. Familia, ¡Por fin terminé!

A mi querido Ricky, a quien agradezco inmensamente por estar siempre a mi lado en todo momento y en cada paso que dí. Por apoyarme en mis decisiones y tenerme paciencia en todo este camino. Te dedico este trabajo con mucho amor porque gracias a ti la carga fue un poco más ligera y porque siempre has creído en mí y en mis sueños.

A todos los que me acompañaron en algún momento de mi vida dentro de la Universidad: a mis apreciables maestros, compañeros y amigos. Son tantos sus nombres y bellos recuerdos que una sola hoja no me basta.

Nadie dijo que sería fácil, pero sí que valdría la pena.

¡Saber que se puede, querer que se pueda quitarse los miedos sacarlos afuera pintarse la cara color esperanza tentar al futuro con el corazón. Es mejor perderse que nunca embarcar mejor tentarse a dejar de intentar aunque ya ves que no es tan fácil empezar. Sé que lo imposible se puede lograr que la tristeza algún día se irá y así será la vida cambia y cambiará. Sentirás que el alma vuela por cantar una vez más, Vale más poder brillar que solo buscar ver el sol...!!!

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	iii
DEDICATORIAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	x
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	xi
1.- RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
2. INTRODUCCIÓN	1
3. ANTECEDENTES.....	3
3.1. <i>Entamoeba histolytica</i>	3
3.1.1 Generalidades.....	3
3.1.2 Clasificación taxonómica	4
3.1.3 Epidemiología.....	4
3.1.4 Ciclo de vida	5
3.1.5 Patogénesis.....	5
3.1.6 Tratamiento	6
3.2 Alternativas terapéuticas.....	7
3.2.1 Postbióticos de bacterias ácido lácticas	7
3.3 Bacteriocinas	8
3.4 Encapsulación/Microencapsulación	10
3.4.1 Generalidades de microencapsulación	10
3.4.2 Técnica de microfluidez:	10
3.4.3 Técnica de encapsulación:	11
3.5 Microscopio de Fuerza Atómica (MFA)	11
4. JUSTIFICACIÓN.....	13
5. HIPÓTESIS.....	14
6. OBJETIVO GENERAL	14
6.1 Objetivos Particulares	14
7.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	15
7.1 Material biológico	15
7.2 Probióticos	15

7.2.1 Mantenimiento:	15
7.2.2 Cinética de crecimiento por método de turbidimetría:.....	15
7.2.3 Obtención de postbióticos (Ptb) de lactobacilos:	16
7.2.4 Obtención de bacteriocinas a partir postbióticos de lactobacilos:.....	16
7.3 Encapsulación de postbióticos y bacteriocinas	17
7.3.1 Microencapsulación de postbióticos en liposomas utilizando dispositivos microfluídicos:	17
7.3.2 Encapsulación de bacteriocinas en alginato de sodio y liberación controlada a pH específicos:.....	18
7.4 <i>Entamoeba histolytica</i>	18
7.4.1 Mantenimiento:	18
7.4.2 Cinética de crecimiento bajo condiciones axénicas <i>in vitro</i> :.....	19
7.5 Bioensayos para evaluar la actividad antimicrobiana de postbióticos y bacteriocinas de lactobacilos:	19
7.6 Análisis de alteraciones de la membrana celular de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> cultivados en presencia de bacteriocinas empleando MFA	20
7.6.1 Características del equipo y material:.....	20
7.6.2 Imágenes del escaneo:	20
7.6.3 Rugosidad y tamaño:	20
7.7 Análisis electroforético comparativo (SDS-PAGE) de los componentes proteicos de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> en presencia de encapsulados de bacteriocinas.	21
7.8 Análisis estadístico	22
8. RESULTADOS	23
8.1 Probióticos	23
8.1.1 Cinética de crecimiento:	23
8.2 <i>Entamoeba histolytica</i>	24
8.2.1 Cinética de crecimiento:	24
8.3. Obtención de postbióticos de <i>L. casei</i> / <i>L. plantarum</i> y determinar la actividad biológica sobre trofozoítos de <i>E. histolytica</i> HM1-IMSS.	25
8.4 Obtención de bacteriocinas a partir de postbióticos de <i>L. casei</i> y <i>L. plantarum</i> y análisis cualitativo.....	26
8.5 Evaluación de la actividad biológica de las bacteriocinas de <i>L. casei</i> y <i>L. plantarum</i> sobre trofozoítos de <i>E. histolytica</i> HM1-IMSS.....	26

8.6 Encapsulación	28
8.6.1 Microencapsulación:	28
8.6.2 Encapsulación de bacteriocinas de liberación controlada empleando alginato de sodio:	30
8.6.3 Impacto biológico de las cápsulas de alginato sobre los cultivos de trofozoítos de <i>E. histolytica</i>:	30
8.6.4 Evaluación de la capacidad para liberación de bacteriocinas:	32
8.6.5 Evaluación de la bacteriocina Nisina® encapsulada y actividad biológica sobre el cultivo de trofozoíto de <i>E. histolytica</i> HM1-IMSS	33
8.7 Caracterización al MFA el impacto de las bacteriocinas sobre la membrana celular de trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	37
8.8Análisis electroforético comparativo (SDS-PAGE) de los componentes proteicos de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> en presencia de bacteriocinas de <i>L. casei</i> + <i>L. plantarum</i>.	40
9. DISCUSIÓN	42
10. CONCLUSIONES	52
11. PERSPECTIVAS	53
12. BIBLIOGRAFÍA	54
RESUMEN BIOGRÁFICO	65

ÍNDICE DE FIGURAS

ORDEN	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
Figura 1.	La membrana de los microorganismos regularmente es catiónica la cual atrae a los péptidos antimicrobianos debido a que regularmente son catiónicos (A). Los péptidos antimicrobianos se unen y se insertan en la membrana fosfolipídica (B) los cuales llegan a formar poros en la membrana celular, los cuales llevan a la lisis de la célula (c). Imagen tomada de Rivas et al. 2006.	---- 9
Figura 2.	Procedimiento para realizar la cinética de crecimiento de <i>L. casei</i> y <i>L. plantarum</i> .	---- 15
Figura 3.	Procedimiento para realizar la cinética de crecimiento de <i>L. casei</i> y <i>L. plantarum</i> .	---- 16
Figura 4.	Procedimiento para la obtención de bacteriocinas de <i>L. casei</i> y <i>L. plantarum</i> .	---- 17
Figura 5.	Procedimiento para la encapsulación de bacteriocinas de <i>L. casei</i> y <i>L. plantarum</i> y evaluación de la liberación a pH específicos	---- 18
Figura 6.	Procedimiento para realizar la cinética de crecimiento de <i>E. histolytica</i> .	---- 19
Figura 7.	Cinética de crecimiento de probióticos (<i>L. casei</i> y <i>L. plantarum</i>). Esta cinética fue realizada empleando el medio MPT para probióticos. Cada punto representa el promedio de la lectura en tres eventos independientes por triplicado.	---- 23
Figura 8.	Cinética de crecimiento de <i>E. histolytica</i> bajo condiciones axénicas <i>in vitro</i>. Esta cinética fue realizada empleando el medio MPT. Los resultados obtenidos mostraron un rendimiento de aproximadamente 200,000 cel/mL que son el resultado de tres eventos independientes por triplicado	---- 24
Figura 9.	Morfología del trofozoíto de <i>E. histolytica</i>. En la imagen se observan trofozoítos que muestran el aspecto típico pleomórfico característico de esta fase de crecimiento. Observación realizada a 400X en microscopio óptico	---- 24
Figura 10.	Rendimiento celular de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> en presencia de postbióticos. Comparación del rendimiento celular de trofozoítos cultivados en presencia de liofilizado de postbióticos de <i>L. casei</i> y <i>L. plantarum</i> a las concentraciones de 1 y 10 mg/mL.	---- 25
Figura 11.	Prueba de Biuret para la determinación cualitativa de proteínas a los dializados de <i>L. casei</i> y <i>L. plantarum</i>. Control – (Medio MPT) y Control + (Suero bovino adulto).	---- 26
Figura 12.	Rendimiento celular de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> cultivados en presencia de bacteriocinas de <i>L. plantarum</i> (barras verdes), bacteriocinas de <i>L. casei</i> (barras naranjas), Nisina (barras ámbar) y la sinergia de bacteriocinas de <i>L. casei</i> + <i>L. plantarum</i> (barra roja). (Autoría propia).	---- 27
Figura 13.	Aspecto de los cultivos de <i>E. histolytica</i> control y cultivados en presencia de bacteriocinas de <i>L. casei</i> y <i>L. plantarum</i>, observaciones realizadas al microscopio óptico (400X).	---- 28

Figura 14. Dispositivo para realizar la microencapsulación de postbióticos.	----	29
Figura 15. Micrografía que muestra la vesícula lipídica conteniendo postbióticos al 1% vol/vol (a), vesícula lipídica que contiene postbióticos teñidos con FSS y excitación LED de 365 nm.	----	29
Figura 16. Aspetto general de las microcápsulas de alginato obtenidas por gelificación.	----	30
Figura 17. En la imagen a) se observa un cultivo amibiano en presencia de cápsulas de alginato, en b) imagen obtenida al invertoscopio en el cual se aprecia la interacción de los cultivos amibianos y las cápsulas de alginato, en c y d) imágenes tomadas al invertoscopio en los cuales se aprecian los cultivos amibianos. (400X).	----	31
Figura 18. Comparación del rendimiento de <i>E. histolytica</i> control y en presencia de alginato. No se observa diferencia significativa	----	31
Figura 19. Cinética de liberación de azul de Comassie+ bacteriocinas.	----	32
Figura 20. Evaluación de la liberación de bacteriocinas a pH específico.	----	33
Figura 21. Rendimiento celular de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> en presencia de cápsulas albendazol, metronidazol y nisina [1 mg/mL].	----	34
Figura 22. Aspecto de los cultivos de <i>E. histolytica</i> en presencia de Nistatina, albendazol y metronidazol, observaciones realizadas al invertoscopio a 400X.	----	35
Figura 23. Rendimiento celular de trofozoítos de <i>E. histolytica</i>. a) en presencia de cápsulas conteniendo la sinergia de los postbióticos (<i>L. casei</i> + <i>L. plantarum</i>) y bacteriocinas a una concentración de 1 mg/mL e incubadas a 37 °C/ 72 h	----	35
Figura 24. Comparación de la actividad antiamebiana de los postbióticos, bacteriocinas y bacteriocinas encapsuladas de <i>L. plantarum</i> y <i>L. casei</i> .	----	36
Figura 25. Análisis comparativo del análisis morfométrico de <i>E. histolytica</i> cultivado en presencia de bacteriocinas de <i>L. casei</i> + <i>L. plantarum</i> tomando como referencia los valores morfométricos de un cultivo control.	----	38
Figura 26a. Análisis comparativo al AFM de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> control y en presencia de encapsulados de sinergia de bacteriocinas de <i>Lactobacillus</i> sp.	----	39
Figura 26b. Análisis comparativo al AFM de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> control y en presencia de encapsulados de sinergia de bacteriocinas de <i>Lactobacillus</i> sp.	----	40
Figura 27. Comparación del patrón electroforético de proteínas totales de <i>E. histolytica</i> cultivado en presencia de bacteriocinas de <i>Lactobacillus</i> sp.	----	41
Figura 28. Mecanismo de acción de la nisina (Adaptado de Cotter et al. 2005).	----	48

ÍNDICE DE TABLAS

ORDEN	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
Tabla 1.	Cuadro comparativo en donde se muestra la actividad antiamibiana de los postbióticos, bacteriocinas y bacteriocinas encapsuladas de <i>L. plantarum</i> y <i>L. casei</i> .	----- 37
Tabla 2.	Análisis de características morfométricas de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> cultivado en presencia de la sinergia de bacteriocinas de <i>L. casei</i> + <i>L. plantarum</i>	----- 38

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

AHA	Absceso hepático amibiano
BAL	Bacterias Ácido Lácticas
cm	Centímetros
Da	Daltones
ESQ	Estructura Semejante a Quiste
FDA	Food and Drug Administration
FAO	Food and Agriculture Organization
FE	Factores Extracelulares
g	Gramos
GRAS	Generally Recognized As Safe
h	Hora
kDa	kiloDaltones
L	Litros
Lb	Libras
M	Molar
MEB	Microscopía Electrónica de Barrido
MF	Microscopía de Fluorescencia
MFA	Microscopía de Fuerza Atómica
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MO	Microscopía Óptica
nm	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
pH	Potencial de hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SINAVE	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µm	Micrómetros

1.- RESUMEN

La amibiasis es una infección parasitaria causada por el protozooario *Entamoeba histolytica*. Representa una de las tres primeras causas de muerte por parásitos protozoarios a nivel mundial. Su incidencia es máxima en regiones tropicales y subtropicales que presentan deficiencias sanitarias. En México es uno de los principales problemas de salud pública por su frecuencia, mortalidad y fácil dispersión y la OMS la ha catalogado dentro del grupo de “Enfermedades infecciosas olvidadas” debido a los pocos estudios que se realizan al respecto, principalmente por la dificultad para mantener los cultivos *in vitro*. Los pacientes infectados por *E. histolytica* eliminan trofozoítos no infecciosos y quistes infecciosos en sus heces y la contaminación de alimentos y agua es la principal fuente para transmitir quistes. La droga de elección para el tratamiento de amibiasis y sus múltiples manifestaciones clínicas es el metronidazol y sus derivados imidazólicos, sin embargo presenta efectos secundarios indeseables en los pacientes. Por ello se buscan alternativas para el tratamiento de esta infección. En la búsqueda de nuevos agentes antiamibianos se han evaluado diversos metabolitos secundarios de diversas plantas, algas y recientemente se han estudiado los probióticos, sus postbióticos entre los cuales se encuentran las bacteriocinas. Por otra parte, la microencapsulación se define como una tecnología de embalaje de sólidos, líquidos o materiales gaseosos en miniatura, cápsulas selladas que pueden liberar sus contenidos a velocidades controladas bajo las influencias de condiciones específicas. En este trabajo se obtuvieron los postbióticos y bacteriocinas liofilizadas a partir de *L. casei* y *L. plantarum*, además se encapsularon (empleando la técnica de emulsión doble y con la técnica de gelificación por goteo con alginato de sodio y liberación controlada) posteriormente se evaluaron sobre los cultivos axénicos *in vitro* de *E. histolytica*, se empleó como control positivo la nistatina la cual es una bacteriocina tipo GRAS, una vez que se determinó el porcentaje de inhibición por parte de las bacteriocinas sobre los trofozoítos, se analizó la topografía y parámetros morfométricos de los trofozoítos de *E. histolytica* empleando el microscopio de fuerza atómica (AFM) a través de este análisis se pudo observar las imágenes en 3D de los trofozoítos obtenidos de cada tratamiento y se pudo determinar que las células son más rugosas cuando son cultivados en presencia de bacteriocinas, además se analizó el patrón electroforético de las proteínas presentes en la membrana celular de trofozoítos control y cultivados en presencia de bacteriocinas, los resultados indican que *E. histolytica* cultivada en presencia de bacteriocinas de *L. casei*+*L. plantarum* no se observan bandas de proteínas que corresponden al grupo de actinas (importantes para el desplazamiento celular) y al grupo de cisteína proteasas (importantes para la lisis celular). Los resultados obtenidos en este trabajo permitirán diseñar estrategias y/o tratamientos encaminados al control de *E. histolytica*.

ABSTRACT

Amebiasis is a parasitic infection caused by the protozoan *Entamoeba histolytica*. It represents one of the first three causes of death by protozoan parasites worldwide. Its incidence is maximum in tropical and subtropical regions that have health deficiencies. In Mexico, it is one of the main public health problems due to its frequency, mortality and easy dispersion, and WHO has listed it as part of the group of “Forgotten infectious diseases” due to the few studies carried out in this regard, mainly due to the difficulty in keep the cultures *in vitro*. Patients infected with *E. histolytica* eliminate non-infectious trophozoites and infectious cysts in their feces and contamination of food and water is the main source for transmitting cysts. The drug of choice for the treatment of amoebiasis and its multiple clinical manifestations is metronidazole and its imidazole derivatives, however it presents undesirable side effects in patients. Therefore, alternatives are sought for the treatment of this infection. In the search for new antimicrobial agents, various secondary metabolites of various plants, algae have been evaluated and probiotics, their postbiotics, among which are bacteriocins, have recently been studied. On the other hand, microencapsulation is defined as a packaging technology for solids, liquids or gaseous materials in miniature, sealed capsules that can release their contents at controlled speeds under the influence of specific conditions. In this work, the lyophilized postbiotics and bacteriocins were obtained from *L. casei* and *L. plantarum*, in addition they were encapsulated (using the double emulsion technique and with the drip gelation technique with sodium alginate and controlled release). subsequently they were evaluated on the *in vitro* axenic cultures of *E. histolytica*, the nystatin which is a GRAS type bacteriocin was used as a positive control, once the percentage of inhibition by bacteriocins on trophozoites was determined, the topography and morphometric parameters of *E. histolytica* trophozoites were analyzed using atomic force microscopy (AFM) through this analysis it was possible to observe the 3D images of the trophozoites obtained from each treatment and it could be determined that the cells are more rugged when they are cultured in the presence of bacteriocins, In addition, the electrophoretic pattern of the proteins present in the cell membrane of control trophozoites and cultured in the presence of bacteriocins was analyzed. The results indicate that *E. histolytica* cultured in the presence of *L. casei* + *L. plantarum*. Bacteriocins protein bands that correspond to the group of actins (important for cell displacement) and the cysteine protease group (important for the cell lysis process) are not observed. The results obtained in this work will allow designing strategies or treatments aimed at the control of *E. histolytica*.

2. INTRODUCCIÓN

La amibiasis es definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como la infección provocada por *Entamoeba histolytica*. Este parásito protozooario tiene una distribución global y especialmente una prevalencia alta en países donde predominan condiciones socioeconómicas y sanitarias pobres. La amibiasis intestinal ocupó el séptimo lugar como causa de morbilidad por casos nuevos en México (INEGI, 2008). A pesar de que el 90% de las infecciones amebianas son asintomáticas y autolimitantes, existe un estimado de 50 millones de casos de infección anuales. De acuerdo con la OMS, *E. histolytica* se encuentra clasificado como el tercer parásito responsable de muertes con un estimado de 100,000 defunciones al año (González et al. 2012). La droga de elección para el tratamiento de la amibiasis y sus múltiples manifestaciones clínicas es el metronidazol, sin embargo presenta efectos secundarios indeseables en el humano y además existen reportes recientes de que algunas cepas de *E. histolytica* presentan resistencia a esta droga (Barrón et al. 2008). Debido a la importancia médica que posee, se ha vuelto necesario tener un mayor entendimiento del parásito y su interacción con diferentes compuestos, en busca de aquellos que consigan su inhibición.

En la búsqueda de alternativas terapéuticas para diversas enfermedades, se han realizado investigaciones empleando las Bacterias Ácido Lácticas (BAL), algunas de las cuales se les considera probióticos, y una de las características de los metabolitos extracelulares de los probióticos es su capacidad de inhibir un amplio rango de microorganismos de importancia alimentaria y médica. Las BAL, se caracterizan por metabolizar diversas fuentes de carbono y aminoácidos y producir ácidos grasos de cadena corta, peróxido de hidrógeno, ácido láctico, proteínas y péptidos a los cuales se les considera bacteriocinas, las cuales constituyen un grupo heterogéneo de péptidos que presentan una gran variedad de características fisicoquímicas y espectros de acción antimicrobiana.

Las bacteriocinas se han encontrado en casi todas las especies bacterianas estudiadas hasta la fecha y se ha observado que dentro de una misma especie se pueden producir diferentes tipos de bacteriocinas. Poseen espectros particulares de inhibición, esta característica

permite su uso en la industria de los alimentos en procesos que requieren la inhibición del crecimiento de bacterias que alteran los alimentos o patógenos como *Listeria monocytogenes* y *Salmonella typhi* o *Staphylococcus* spp (Varo 2010).

Por otra parte, la microencapsulación se define como una tecnología de embalaje de sólidos, líquidos o materiales gaseosos en miniatura, cápsulas selladas que pueden liberar sus contenidos a velocidades controladas bajo las influencias de condiciones específicas (Anselmo et al. 2016).

Tradicionalmente, para observar características típicas de los microorganismos se emplean diversas tinciones y técnicas específicas. Para realizar las observaciones de dicho material biológico se emplea herramientas como microscopio óptico y de fluorescencia; para observar la estructura interna celular se ha empleado principalmente el microscopio electrónico de transmisión y para realizar la observación topológica se emplea el microscopio de barrido (León 2012). Sin embargo, en la actualidad se pueden realizar análisis empleando nuevas herramientas microscópicas, como el Microscopio de Fuerza Atómica (MFA). El MFA es una herramienta capaz de permitir observar estructuras a resolución nanométrica y con la opción de analizar las propiedades físicas y mecánicas de los materiales a esta escala, permitiendo así el estudio de material biológico (Leroux et al. 1996).

Es capaz de generar imágenes de muestras biológicas tanto fijadas como vivas en condiciones fisiológicas. Además que proporciona imágenes tridimensionales de superficies con muy alta resolución espacial que permiten cuantificar la profundidad y morfología de las muestras en tiempo real, en el orden de los nanómetros (Martínez 2014). La introducción de esta microscopía en estudios microbiológicos ha ayudado a los investigadores con un nuevo dispositivo para el análisis de la morfología bacteriana. Las características morfológicas específicas de la pared celular bacteriana podrían ser útiles en la identificación de factores específicos asociados a diversas enfermedades (Germano et al. 2013). El desarrollo de esta técnica podría tener aplicaciones en áreas diferenciadas, como la biomedicina, la nanotecnología, la ciencia de materiales o estudios medioambientales.

3. ANTECEDENTES

3.1. *Entamoeba histolytica*

3.1.1 Generalidades

Entamoeba histolytica, agente causal de la amibiasis, constituye la tercera causa de mortalidad debida a infección parasitaria, después de la malaria y la esquistosomiasis, particularmente en países en vías de desarrollo (Walsh 1986). *Entamoeba histolytica* y el cuadro clínico de amebiasis intestinal fueron descritos en 1875 por primera vez por Fedor Lösch en San Petersburgo, Rusia. Es una especie patógena para el ser humano y es la responsable de la disentería amebiana (Ríos et al. 2012).

Es un protozoo que presenta dos formas en su ciclo vital: quiste y trofozoíto. Los quistes son estructuras redondeadas de 10 a 16 μm , con una cubierta gruesa y que presenta en su interior 1 a 4 núcleos. El trofozoíto tiene un diámetro de 10 a 60 μm , es móvil y se desplaza por medio de un seudópodo largo (Gómez et al. 2007).

En 1925, Brunt propuso que existían dos especies distintas, una patógena y una no patógena, aunque morfológicamente iguales. En 1961, Diamond logró el primer cultivo axénico y en 1978, Sargeant diferenció la variante patógena de *E. histolytica* de una no patógena mediante patrones electroforéticos de isoenzimas. En 1993, Diamond demostró que realmente eran dos especies diferentes y en 1997, la OMS recomendó que se diferencien las dos especies para efectos de diagnóstico y tratamiento, y cuando el diagnóstico se lleva a cabo por microscopía óptica, se reporte como *E. histolytica/dispar* (Gómez et al. 2007). Hasta hace unos años se consideraba que el 10% de la población mundial estaba infectada por *E. histolytica*. Sin embargo, con la aparición de los métodos de diagnóstico molecular, se ha confirmado que la mayor parte de estas infecciones son causadas por *E. dispar*. El 90% de los individuos asintomáticos se encuentran infectados por *E. dispar* y solo el 10% por *E. histolytica* (Ríos et al. 2012).

3.1.2 Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica de este parásito de acuerdo a Cavalier 1998, es la siguiente:

Superreino:	Eukaryota
Reino:	Protozoa
Subreino:	Neozoa
Infrarreino:	Sarcomastigota
Filo:	Amoebozoa
Subfilo:	Conosa
Infrafilo:	Archamoeba
Clase:	Entamoebae
Orden:	Entamoebida
Familia:	Entamoebidae
Género:	<i>Entamoeba</i>
Especie:	<i>Entamoeba histolytica</i>

3.1.3 Epidemiología

La amibiasis es una de las parasitosis más tempranamente reconocidas y universales. Es la cuarta causa de muerte en el mundo debida a infección por protozoarios, después del paludismo, la enfermedad de Chagas y la leishmaniasis y la tercera causa de morbilidad después del paludismo y la tricomoniasis (Gómez et al. 2007).

E. histolytica presenta distribución mundial. Es endémica en países con instalaciones y condiciones higiénico-sanitarias deficientes, donde no hay barreras entre las heces contaminadas con quistes, los alimentos y el agua. Las zonas endémicas son México y los países de Sudamérica, de África y del Sudeste Asiático. La mayoría de los casos de amebiasis en América del Norte y Europa son importados (Tanyuksel and Petri 2003).

Los pacientes infectados por *E. histolytica* eliminan trofozoítos no infecciosos y quistes infecciosos en sus heces. Los trofozoítos no pueden sobrevivir en el ambiente externo ni ser transportados a través del estómago si son ingeridos. Por este motivo, la principal fuente de contaminación de los alimentos y el agua es el portador asintomático que transmite los quistes (Murray et al. 2007).

Según el Instituto Nacional de Estadística y Geografía, la amebiasis intestinal ocupó el séptimo lugar como causa de morbilidad por casos nuevos en México en el 2008 (INEGI, 2008). De acuerdo a los datos del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), existe una disminución constante en la incidencia de amebiasis intestinal en México, durante el período de 2005 a 2007, pasando de 716.71 casos por 100 mil habitantes en 2005 a 543.37 casos por 100 mil habitantes en 2007. En México se considera 16 millones de portadores, 1.3 millones de enfermos y 10 mil a 30 mil muertes. En base a estos datos, puede afirmarse que la amibiasis se encuentra entre las primeras causas de morbimortalidad en el país (Gutiérrez y Muñoz 1994; Martínez 1987).

3.1.4 Ciclo de vida

El hombre es el principal reservorio de *E. histolytica*. La vía de transmisión es fecal-oral. El ciclo se inicia con la ingestión de un quiste maduro (infeccioso). Gracias a su dura cubierta no es dañado, aunque si reblandecido, por la acción de los jugos gástrico y pancreático. El aumento de pH y la tripsina favorecen el rompimiento del quiste y la liberación de los trofozoítos en el intestino grueso dando lugar a cuatro trofozoítos metaquisticos que se multiplican por fisión binaria y pueden desarrollar infección invasora o no hacerlo (Gómez et al. 2007; Ríos et al. 2012). En la luz del intestino, los trofozoítos eliminan las vacuolas alimenticias, se inmovilizan y se transforman en prequistes mediante la adquisición de una cubierta, para posteriormente convertirse en quistes inmaduros con un núcleo (Gutiérrez 2008).

En la mayoría de los casos se produce una infección asintomática, los trofozoítos permanecen formando agregados en la capa de mucina donde se produce enquistación sin producción de invasión. Aproximadamente el 10% de los casos invaden la pared del colon provocando a ese nivel una necrosis local intensa. Finalmente se transforman en quistes maduros tetranucleados que son eliminados por las heces, cerrándose el ciclo.

3.1.5 Patogénesis

Existen factores que contribuyen a la generación de un estado patológico causado por esta amiba. El proceso de invasión puede ser ocasionado por mecanismos físicos y moleculares (Gómez *et al.*, 2007). La adherencia que posean estos trofozoítos es también un factor

importante en la virulencia y patogénesis (Sehgal et al. 1996) y su adherencia a las células blanco es un paso determinante para la citotoxicidad del parásito (Trejos y Castaño 2009).

La capa de mucina que recubre el epitelio del colon es el principal obstáculo para invadirlo, por lo que desarrolló sofisticados mecanismos para penetrarla. Son tres fases: colonización, disminución o disrupción de la mucosa y enlace, y lisis de las células epiteliales del colon del hospedero.

Lesión inespecífica: engrosamiento de la mucosa, hiperplasia glandular y edema del estroma. Ocurre la etapa de colonización e inicia la fase de disrupción de la mucosa. La adherencia es difícil debido a cargas negativas de la mucosa, pero por medio de la lectina galactosa-N-acetil-D-galactosamina se adhiere a ésta.

Depresión mucopénica: Se aprecian pequeñas depresiones asociadas a pérdida de mucosa, con adherencia de trofozoítos a ellas. Las células caliciformes encargadas de la producción de mucina agotan su capacidad de reponer la mucina.

Lesión invasiva temprana con invasión superficial: Se presenta: erosión epitelial superficial, focos de microinvasión interglandular e infiltración de la lámina propia.

Lesión invasiva tardía con ulceración profunda: a medida que avanza la invasión, la úlcera se extiende profundamente en un área mayor de la submucosa, dado que el tejido subyacente al epitelio interglandular ofrece menor resistencia, lo que da lugar a las típicas úlceras “en botón”.

3.1.6 Tratamiento

La OMS recomienda que cuando sea posible, *E. histolytica* deberá de ser diferenciada de especies morfológicamente similares y dar el tratamiento de manera aprobada, ya que un tratamiento innecesario podría favorecer el desarrollo de resistencia. Por lo tanto, la profilaxis para la infección por *E. histolytica* con amebicidas no es recomendada bajo ninguna circunstancia. El metronidazol es la droga de elección debido a que presenta una rápida absorción intestinal, una excelente biodisponibilidad en tejido y una buena penetración en el absceso (Gómez et al. 2007). El uso de este tipo de droga antiamibiana actúa contra los trofozoítos de *E. histolytica* pero es incapaz de penetrar la pared de los quistes. Sin embargo, una de las desventajas que presenta esta droga es que tiene múltiples

efectos secundarios indeseables en los humanos, tales como: reacciones gastrointestinales, reacciones alérgicas, reacciones del sistema nervioso, trastornos mentales, así como daños transitorios de la visión y hepatobiliares. También existen otros amebicidas que pueden producir toxicidad, efectos secundarios indeseables y resistencias, por lo que se ha dado a la búsqueda de tratamientos alternativos para combatir este parásito. La FAO y la OMS han indicado con evidencia científica el potencial de los probióticos que proporcionan beneficios en la salud y son seguros para uso humano.

3.2 Alternativas terapéuticas

3.2.1 Postbióticos de bacterias ácido lácticas

El término probiótico se define como: organismos vivos, principalmente bacterias, usados en forma de suplementos nutricionales que, tras ser ingeridos en cantidades suficientes, pueden mejorar el equilibrio microbiano en el intestino de las personas o animales que los ingieren provocando efectos favorables sobre su salud, más allá de los efectos nutricionales tradicionales (Amores et al. 2004). La alteración de la microbiota intestinal causada por las bacterias ácido lácticas (BAL) o denominados también como probióticos, influyen directa e indirectamente en el estado de salud por la producción de vitaminas y ácidos grasos de cadena corta, degradación de sustancias alimenticias no digeridas, estimulación de la respuesta inmune y protección frente a microorganismos enteropatógenos (Lee and Salminen 1995).

Pruebas con animales y estudios *in vitro* han demostrado que las cepas probióticas pueden ejercer una acción protectora en el intestino, al adherirse y colonizar al epitelio del intestino, compiten por los receptores, lo que previene la colonización de los patógenos. Este mecanismo no ha sido esclarecido del todo (Varo, 2010). Existen metabolitos secundarios de las bacterias ácido lácticas que poseen capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos, tal es el caso de los postbióticos. Estos deben ser metabólicamente estables y activos en el producto alimenticio al cual se agreguen, sobrevivir al paso a través del tracto digestivo (enfrentar cambios abruptos en el pH) y tener efectos benéficos en el huésped. Sin embargo, todavía hay varios problemas con respecto a la baja viabilidad de las bacterias probióticas en los productos lácteos, incluyendo acidez titulable, pH, contenido de peróxido de hidrogeno, y de oxígeno disuelto, temperatura de almacenamiento, especies y cepas de organismos de productos lácteos fermentados,

concentración de ácido láctico y acético e incluso la concentración de proteína en el suero de leche (Anselmo et al. 2016).

3.3 Bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos sintetizados ribosómicamente por las bacterias productoras. Recientemente estas proteínas han despertado gran interés en la investigación. Las bacteriocinas son sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido-lácticas (BAL), de naturaleza peptídica y activas. En la mayoría de los casos, la producción de bacteriocinas, es regulada solo bajo ciertas condiciones de crecimiento, por lo que aspectos como la composición del medio de cultivo, temperatura, pH, actividad de agua, podrían ser cruciales en la producción de bacteriocinas (Nahuelquín 2008).

Las bacteriocinas se han encontrado en casi todas las especies bacterianas estudiadas hasta la fecha y se ha observado que dentro de una misma especie se pueden producir diferentes tipos de bacteriocinas, debido a esto existe una enorme diversidad de este tipo de sustancias (González et al. 2003) han considerado a las bacteriocinas como péptidos biológicamente activos que presentan efectos bactericidas.

Según Rivas et al. 2006, las moléculas que presentan interferencia microbiana directa son principalmente los péptidos antimicrobianos, los cuales son de bajo peso molecular (3-4.5kD) y que son principalmente catiónicos (Frantz et al. 2005; Reddy et al. 2004 y Ganz 2004). Estos péptidos tienen un amplio espectro en contra de bacterias Gram positivas, Gram negativas, hongos y virus envueltos (Ganz 2004 y Koczulla and Bals 2003). Los péptidos por su carga positiva, son atraídos por la membrana del microorganismo que regularmente tiene carga negativa. La unión de estos péptidos a la membrana ocasiona que estos se aglutinen formando poros en la membrana del microorganismo llevando así a su lisis (Figura 1).

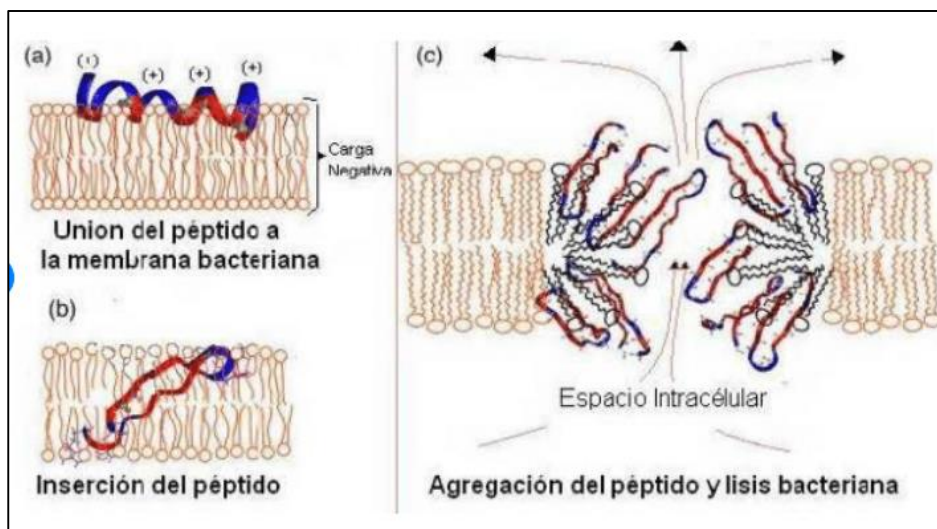


Figura 1. La membrana de los microorganismos regularmente es cationica la cual atrae a los péptidos antimicrobianos debido a que regularmente son catiónicos (A). Los péptidos antimicrobianos se unen y se insertan en la membrana fosfolipídica (B) los cuales llegan a formar poros en la membrana celular, los cuales llevan a la lisis de la célula (c). Imagen tomada de Rivas et al. 2006.

Las bacteriocinas poseen espectros particulares de inhibición, esta característica permite su uso en la industria de los alimentos en procesos que requieren la inhibición del crecimiento de bacterias que alteran los alimentos o patógenos como *Listeria monocytogenes* y *Salmonella typhi* o *Staphylococcus spp* (Agudelo et al. 2015) o bien protozoarios parásitos de importancia médica como *Giardia lamblia*, *Trichomonas vaginalis* y *Entamoeba histolytica* (Cuellar 2015).

Existen estudios acerca de la evaluación de la producción de bacteriocinas a partir de Lactobacilos y Bifidobacterias, en donde se utilizaron grupos de bacterias ácido lácticas para que produjeran bacteriocinas con actividad antimicrobiana eficiente frente a microorganismos como *Bacillus sphaericus*, *B. cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *P. putida*. Se identificaron las bacterias potenciales y se cultivaron en medios de cultivo enriquecido con fructooligosacáridos para obtener la sustancia antimicrobiana. Se encontró que la adición de fructooligosacáridos a la producción de bacteriocinas aumentó la potencia de la sustancia producida al igual que la velocidad de crecimiento en la fase exponencial del microorganismo. La actividad antimicrobiana fue muy prometedora principalmente

contra las pseudomonas y esta sustancia puede ser utilizada como posible conservante de alimentos (Jaramillo et al. 2010).

3.4 Encapsulación/Microencapsulación

3.4.1 Generalidades de microencapsulación: La microencapsulación se define como una tecnología de embalaje de sólidos, líquidos o materiales gaseosos en miniatura, cápsulas selladas que pueden liberar sus contenidos a velocidades controladas bajo las influencias de condiciones específicas (Anselmo AC, *et al.*, 2016). Una microcápsula es una partícula en escala de micrómetros, burbuja o líquido que está rodeado por una coraza. Esta coraza actúa como una barrera para separar el núcleo de un ambiente exterior. Las microcápsulas son candidatos atractivos para encapsular, transportar o liberar de manera controlable una amplia variedad de materiales activos con importancia tecnológica, tales como tensoactivos para una mayor recuperación de petróleo (Sheng 2010), aditivos alimenticios (Madene et al. 2006), productos farmacéuticos (Sang-Ho et al. 2006), componentes cosméticos (Karnik et al. 2008), células y sensores bioquímicos (Kazakova and Shabarchina 2011), catalizadores para reacciones químicas (Poe and Kobaslija 2007), entre otras muchas aplicaciones. En muchas de estas aplicaciones, el núcleo de la microcápsula es un líquido, y la coraza es un sólido que puede resistir un esfuerzo cortante; esta configuración mejora la robustez de la encapsulación. Muchas de las aplicaciones requieren que las corazas tengan propiedades mecánicas específicas, para entender cómo exactamente estas propiedades dependen de la estructura y la composición de la coraza para ayudar a guiar el proceso de fabricación, sin embargo, la elaboración de microcápsulas con estructuras y composiciones bien definidas en experimentos sistemáticos que ayuden a dilucidar su respuesta mecánica sigue siendo deficiente (Weitz 2014).

3.4.2 Técnica de microfluidez: La microfluidez es una tecnología de fabricación multidisciplinar (física, química, ingeniería, biotecnología) que manipula fluidos a escala micrométrica. Esta técnica ofrece un control preciso sobre los flujos de múltiples fluidos, y por tanto una manera de superar estas limitaciones. Una ruta particularmente prometedora es el uso de esta técnica para producir emulsiones dobles, gotas del material del núcleo dentro de gotas de otro fluido, los cuales son suspendidos en una fase fluida continua. Posteriormente se solidifica la fase media generando microcápsulas de coraza sólida. Las

tensiones interfaciales entre los diferentes fluidos fuerzan las gotas a ser esféricas, por otra parte los tamaños de la gota son determinados por las fuerzas de corte ejercidas por los fluidos que fluyen, que pueden ser cuidadosamente ajustados en un dispositivo de microfluidez. Como resultado, las gotas de emulsiones dobles generadas en microfluidez, y las microcápsulas generadas a partir de éstas, pueden ser altamente monodispersas, con composiciones y morfologías que pueden ser manipuladas con un alto grado de precisión.

3.4.3 Técnica de encapsulación: La técnica empleada para encapsular los postbióticos y/o bacteriocinas fue la técnica de alginato de sodio al 2% como soporte de inmovilización (Durán 1997 y Cruz 2007). Se prepara la solución de alginato de sodio a la concentración deseada, empleando agua destilada, se esteriliza la solución y posteriormente se mezcla con los postbióticos deseados. Las cápsulas se obtienen por goteo de la mezcla a través de una aguja en caída libre hacia una solución de CaCl_2 (0.2 M), las cápsulas se dejan por 20 minutos para permitir endurecimiento y posteriormente se almacenaron a 4°C con solución de agua peptonada al 0.03%.

3.5 Microscopio de Fuerza Atómica (MFA)

La incorporación de la nanotecnología es un campo relativamente joven, por lo que ha sido necesario realizar adaptaciones a los equipos y desarrollar nuevas metodologías dirigidas al estudio del material biológico (Leroux et al. 1996). El primer estudio al microscopio electrónico de amibas de *Entamoeba invadens* crecidas axénicamente fue realizado por Siddiqui y Rudzinska, 1965; describieron aspectos referentes a la membrana citoplasmática, nuclear y detallaron los hallazgos citoplásmicos, en el cual se destaca la ausencia de mitocondrias y aparato de Golgi, entre las estructuras citoplasmáticas que resalta se encuentran los cuerpos cromatoides, característicos de quistes, prequistes y trofozoitos. Posteriormente, en un estudio realizado por medio de microscopía electrónica y estudios histoquímicos demostraron que los cuerpos cromatoides en trofozoitos de *E. invadens* crecidos en un medio no axénico, consisten principalmente de ácido ribonucleico y proteínas inespecíficas (Barrón, 2008). El MFA es utilizado en la caracterización de materiales para determinar sus propiedades físicas. Recientemente las capacidades del MFA en el campo de los polímeros han hecho que esta microscopía se revele como una técnica complementaria de otras técnicas de caracterización

microscópicas y difractométricas en la caracterización morfológica, micro- y nanoestructural, así como en un gran número de aplicaciones en las que es la única técnica disponible. El desarrollo de esta técnica podría tener aplicaciones en áreas diferenciadas, como la biomedicina, la nanotecnología, la ciencia de materiales o estudios medioambientales (Ozgur et al. 2007).

Se han hecho estudios con *E. histolytica* donde se obtuvieron nano-imágenes mediante el uso de MFA. La estructura del núcleo, endoplasma y ectoplasma se estudiaron por separado. Se encontró que el diámetro del núcleo de *E. histolytica* fue de 10 μm . En pruebas con células no infectadas y células infectadas, en etapas de trofozoítos y esquizontes, el dispositivo detectó pequeñas diferencias en las medidas de la magnitud y las diferencias aparentemente aleatorias en fase, pero no las suficientes para diferenciar definitivamente entre las etapas (Joshi et al. 2000).

En el 2014 se publicó el primer reporte de la observación de células del estadio de prequiste mediante MFA. En este trabajo observaron *in situ* muestras de trofozoíto, prequiste y quiste de *E. histolytica* mediante MFA e identificaron algunas diferencias de rugosidad, elasticidad, composición y tamaño entre los diferentes estadios (Menchaca et al. 2014).

4. JUSTIFICACIÓN

Entamoeba histolytica es el patógeno intestinal más frecuente de nuestro medio, uno de los principales causantes de diarrea en menores de cinco años. Representa una de las tres primeras causas de muerte por parásitos a nivel mundial. Es un organismo unicelular causante de la amibiasis, enfermedad parasitaria responsable de miles de muertes en México y en el mundo. Posee mecanismos patogénicos complejos que le permiten invadir la mucosa intestinal y causar colitis amebiana. A la fecha la droga de elección para el tratamiento de la amibiasis y sus múltiples manifestaciones clínicas es el metronidazol, sin embargo presenta efectos secundarios indeseables en el humano. La alta incidencia de *E. histolytica* a nivel mundial, así como la predominancia de hospederos asintomáticos ha causado un incremento en el interés científico por el estudio de este parásito. Durante los últimos años ha adquirido gran importancia la aplicación de antimicrobianos de origen natural y entre ellos se encuentran las bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas; las cuales pueden inhibir el crecimiento de un gran número de microorganismos patógenos. En la búsqueda de nuevos agentes antiamebianos se han evaluado diversos metabolitos secundarios de diversas plantas, algas y recientemente se han estudiado las bacteriocinas.

En este trabajo se producirán microcápsulas con la capacidad de encapsular bacteriocinas para analizar su liberación controlada sobre *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS mediante un modelo *in vitro* y se realizará el análisis morfométrico de las células mediante microscopio de fuerza atómica

Por lo tanto, los resultados obtenidos de la investigación permitirán en un futuro diseñar y establecer estrategias y/o tratamientos encaminados al control de *E. histolytica* HM1-IMSS.

5. HIPÓTESIS

Es posible diseñar bacteriocinas encapsuladas de liberación controlada que inhiben el crecimiento axénico *in vitro* de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS y las alteraciones morfológicas pueden ser caracterizadas al microscopio de fuerza atómica (MFA).

6. OBJETIVO GENERAL

Producir bacteriocinas encapsuladas de liberación controlada y analizar su actividad sobre un cultivo axénico *in vitro* de trofozoítos de *E. histolytica* HM1-IMSS y caracterizar las alteraciones celulares mediante microscopía de fuerza atómica.

6.1 Objetivos Particulares

- 1) Establecer la cinética de crecimiento de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS
- 2) Establecer la cinética de crecimiento de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus plantarum*.
- 3) Obtener postbióticos liofilizados (PtbL) de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus plantarum*.
- 4) Obtener bacteriocinas a partir de los postbióticos de *L. casei* y *L. plantarum*.
- 5) Evaluar la actividad biológica de las bacteriocinas de *L. casei* y *L. plantarum* sobre trofozoítos de *E. histolytica* HM1-IMSS.
- 6) Elaborar bacteriocinas encapsuladas y evaluar su capacidad para liberar controlada a pH específicos.
- 7) Evaluar el efecto de los encapsulados de bacteriocinas sobre *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS mediante un modelo *in vitro*.
- 8) Caracterizar al MFA las alteraciones celulares ocasionadas por las bacteriocinas sobre el trofozoíto de *E. histolytica* HM1-IMSS.
- 9) Realizar el análisis electroforético comparativo (SDS-PAGE) de los componentes proteicos de trofozoítos de *E. histolytica* HM1-IMSS en presencia de bacteriocinas.

7.- MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Material biológico

- Bacterias ácido lácticas
 - Lactobacillus casei* (cepa CCRC 10697)
 - Lactobacillus plantarum* (cepa 229)
- Protozario patógeno
 - Entamoeba histolytica* HM1-IMSS
- Suero bovino adulto estéril

7.2 Probióticos

7.2.1 Mantenimiento: Cada cultivo de *L. casei* y *L. plantarum* se mantuvo en refrigeración a 4°C en medio MPT para probióticos. La reactivación de cada cepa se realizó tomando 50 µL y se inocularon en tubos de borosilicato de 13x150 mm que contenía 5 mL de medio MPT para probióticos y se incubaron de 24 h a 37 °C.

7.2.2 Cinética de crecimiento por método de turbidimetría: Frente al mechero se inocularon por separado 60 µL de *L. casei* y *L. plantarum* en nueve tubos de borosilicato de 13x150 mm que contenía 5 mL de medio MPT para probióticos, ajustando la absorbancia a 0.1nm. Posteriormente, se incubaron a 37 °C y cada hora se realizaron las lecturas de absorbancia empleando un espectrofotómetro (SPECTRONIC® GENESYS 5) a una longitud de onda de 635 nm. Se registraron los datos y se graficó. (Figura 2)



Figura 2. Procedimiento para realizar la cinética de crecimiento de *L. casei* y *L. plantarum*.

7.2.3 Obtención de postbióticos (Ptb) de lactobacilos: En un litro de medio MPT-caldo se inoculó, por separado, 1% de cultivo de *L. casei* y *L. plantarum* a una concentración de 400 nm de absorbancia a 635 nm y se incubaron a 37°C por 24 h. En tubos cónicos estériles se centrifugó el cultivo a 2500 rpm/20 min, se separó el precipitado, se recuperó el sobrenadante. El material recuperado se esterilizó por filtración (Millipore de 0.22 µm), se realizó la prueba de esterilidad y el sobrenadante estéril es considerado como el “postbiótico de lactobacilos” (Figura 3)



Figura 3. Procedimiento para realizar la cinética de crecimiento de *L. casei* y *L. plantarum*.

7.2.4 Obtención de bacteriocinas a partir postbióticos de lactobacilos: Para la obtención de las bacteriocinas se utilizó la metodología ya estandarizada de precipitación con sulfato de amonio. En un matraz se colocaron los postbióticos de cada bacteria ácido láctica y se agregó sulfato de amonio para precipitación de las proteínas. El matraz se dejó en agitación por 24 h a 4 °C en un baño con hielo. A continuación, el contenido de los matraces se centrifugó a 2,547 rpm/h. El precipitado se resuspendió con buffer de fosfatos 0.2 M a un pH 7.2. Enseguida, el precipitado se dializó. Los dializados se llevaron a un liofilizador Labconco® a 0.144 Mbar a -43 °C por 48 h para obtener las bacteriocinas liofilizadas (Figura 4)

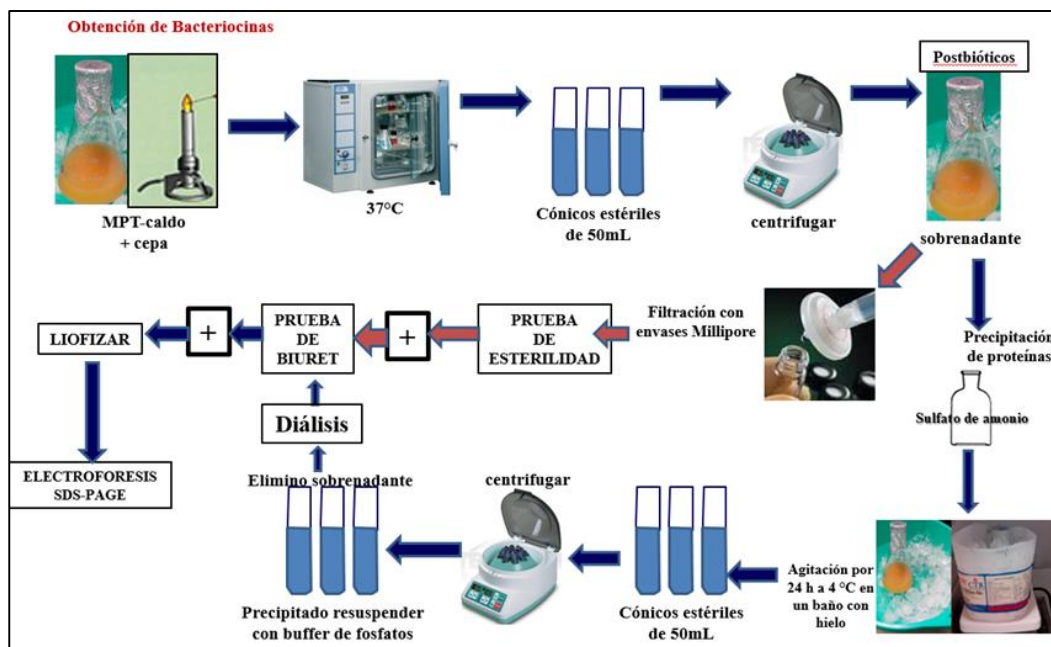


Figura 4. Procedimiento para la obtención de bacteriocinas de *L. casei* y *L. plantarum*.

7.3 Encapsulación de postbióticos y bacteriocinas

7.3.1 Microencapsulación de postbióticos en liposomas utilizando dispositivos

microfluídicos: Se prepararon las disoluciones de las fases interna, media y externa. La fase interna estuvo compuesta por una disolución de postbióticos, 5% wt de alcohol polivinílico (PVA) de peso molecular promedio en peso Mw de 13,000-23,000, 87 – 89% hidrolizado, de la marca Sigma Aldrich. La fase intermedia es una disolución (5 – 15 % wt) de PAA-b-PMMA en una mezcla de 70% cloroformo y 30% tetrahidrofurano (THF). La fase externa es una disolución (10 %) de alcohol polivinílico (PVA) que contiene 15 % wt de tetrahidrofurano (THF). Después de probar cada uno de los dispositivos fabricados, se estableció cuáles de ellos son eficaces para formar las emulsiones dobles que servirán como plantillas para la formación de microcápsulas.

7.3.2 Encapsulación de bacteriocinas en alginato de sodio y liberación controlada a

pH específicos: Se empleó la técnica con alginato de sodio al 2% como soporte de inmovilización (Durán 1997 y Cruz 2007). Se preparó la solución de alginato de sodio, se esterilizó y posteriormente se mezcló con el material deseado, es decir el liofilizado de los postbióticos o las bacteriocinas. Las cápsulas se obtuvieron por goteo de la mezcla a través de una aguja en caída libre de una solución de CaCl_2 (0.2 M), las cápsulas se dejaron reposar por 20 minutos en esta mezcla para permitir endurecimiento y posteriormente se almacenaron a 4°C con solución de agua peptonada al 0.03%. (Figura 5).



Figura 5. Procedimiento para la encapsulación de bacteriocinas de *L. casei* y *L. plantarum* y evaluación de la liberación a pH específicos

7.4 *Entamoeba histolytica*

7.4.1 Mantenimiento: La cepa se mantuvo mediante resiembra sucesivas inoculando 2×10^4 trofozoítos/mL a tubos de borosilicato de 13x150 mm que contenía 5 mL de medio MPT adicionado con 0.55 mL de solución penicilina-estreptomicina-suero. La cepa se incubó a 37°C por 72 h. Antes de cada resiembra los cultivos se observaron en un microscopio invertido para comprobar el buen estado de las amibas. El cultivo que mostró la mejor densidad, células adheridas al sustrato y el mejor aspecto se colocó en un baño agua-hielo por 20 min. Para despegar las células adheridas al tubo, éste se agitó por inversión suave y el número de trofozoítos se determinó tomando una alícuota del cultivo y se colocó en una

cámara de Neubauer para el conteo de trofozoítos/mL. Las resiembras y bioensayos se realizaron cuando las células se encontraron en la mitad de su fase logarítmica de crecimiento.

7.4.2 Cinética de crecimiento bajo condiciones axénicas *in vitro*: Se inocularon 21 tubos de borosilicato de 13x150 mm con tapón de rosca, que contenía 5 mL de medio MPT adicionado con 0.55 mL de solución penicilina-estreptomicina-suero y un inóculo de 1×10^4 trofozoítos/mL. Se incubaron a 37 °C y cada 24 h se determinó el número de trofozoítos/mL a tres tubos del cultivo hasta el séptimo día de incubación. Se realizaron tres lecturas a cada tubo y el conteo de trofozoítos/mL se realizó en cámaras de Neubauer. Posteriormente los resultados se graficaron Figura 6.

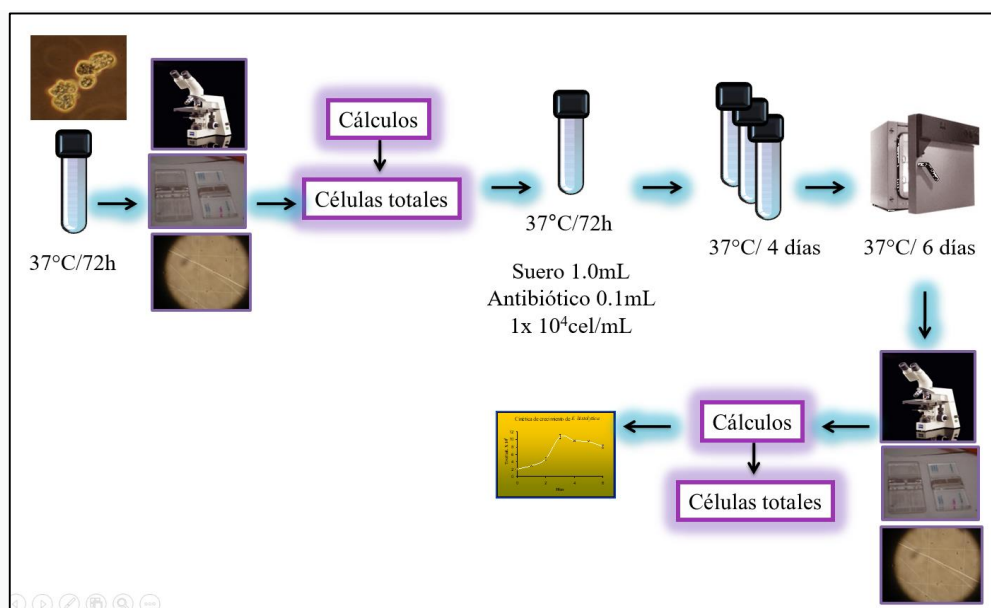


Figura 6. Procedimiento para realizar la cinética de crecimiento de *E. histolytica*.

7.5 Bioensayos para evaluar la actividad antiamebiana de postbióticos y bacteriocinas de lactobacilos: Se realizó la determinación del efecto de los encapsulados de postbióticos liofilizados y bacteriocinas sobre *E. histolytica* HM1-IMSS de acuerdo a la metodología de Barrón et al. 2008, y posteriormente se realizaron mezclas de cada uno de los postbióticos y bacteriocinas (tanto de *L. casei* como de *L. plantarum*) y se evaluó el potencial amebicida de cada uno de ellos. Se determinó en

tres eventos independientes por triplicado el número de trofozoítos/mL por el método de conteo en cámara de Neubauer. En el caso de la evaluación de la actividad antiamibiana de las bacteriocinas sobre los cultivos axénicos *in vitro* de *E. histolytica*, se realizó la determinación de la concentración inhibitoria media (CI₅₀) realizando un Análisis PROBIT mediante el paquete de software estadístico SPSS versión 17.0 (Finney 1952).

7.6 Análisis de alteraciones de la membrana celular de trofozoítos de *E. histolytica* cultivados en presencia de bacteriocinas empleando MFA: Se cultivaron los trofozoítos de *E. histolytica* en presencia de las bacteriocinas que presentaron mayor inhibición sobre estas y se llevó al microscopio de fuerza atómica (MFA) para realizar el análisis nanomecánico y determinar las posibles alteraciones.

7.6.1 Características del equipo y material: Para la obtención de micrografías y la caracterización nanomecánica se utilizó un Microscopio de Fuerza Atómica, modelo NTEGRA PRIMA, marca NT-MDT; el microscopio fue operado en el modo contacto y contacto intermitente. Las puntas utilizadas fueron modelo CSG 10/10 de la misma marca, teniendo una constante de deflexión (kc) nominal especificada por el fabricante de 0.11 N/m aproximadamente, una longitud de $225 \pm 5 \mu\text{m}$ por $30 \pm 3 \mu\text{m}$ de ancho, un espesor de $1.0 \pm 0.5 \mu\text{m}$, con una frecuencia de resonancia de 22 kHz y un radio de curvatura de 6 nm. Se colocó una muestra en placas de vidrio y se fijaron en una superficie modificada con poli-L-lisina (PLL) y se colocaron en portaobjetos especiales para el MFA, posteriormente se analizó empleando la metodología reportada por Menchaca et al. 2014.

7.6.2 Imágenes del escaneo: Se registró la altura, amplitud y fase utilizando el modo contacto intermitente. Las imágenes fueron tomadas a la frecuencia de resonancia fundamental del cantiléver. Las imágenes fueron registradas con velocidades de escaneo típicas de $\frac{1}{2}$ - 1 línea/s utilizando un cabezal de exploración con un alcance máximo de $148 * 148 \mu\text{m}^2$.

7.6.3 Rugosidad y tamaño: El promedio de raíz cuadrada media de la rugosidad de la superficie (R_m) se mide con la siguiente expresión:

$$R_m = \sqrt{\frac{\sum(Z_i - Z_{avg})^2}{Np}}$$

En donde Z_i es el valor Z , Z_{avg} es el promedio de los valores de Z dentro de la zona determinada y Np es el número de puntos dentro de la zona determinada.

7.7 Análisis electroforético comparativo (SDS-PAGE) de los componentes proteicos de trofozoítos de *E. histolytica* en presencia de encapsulados de bacteriocinas.

Los componentes proteicos de los trofozoítos cultivados en presencia de bacteriocinas fueron visualizados mediante electroforesis SDS-PAGE utilizando la técnica descrita por Laemmli, 1970. Para esto se elaborarán geles de poliacrilamida (gel separador al 10% y gel concentrador al 5%) los cuales se realizarán con las siguientes mezclas:

GEL SEPARADOR AL 10%		GEL CONCENTRADOR AL 5%	
Mezclar:	Volumen	Mezclar:	Volumen
Agua destilada	2.442 mL	Agua destilada	1.880 mL
Buffer Tris-SDS ph (8.8)4X	1.250 mL	Buffer Tris-SDS ph (6.8)4X	0.750 mL
Acrilamida al 40%	1.248 mL	Acrilamida al 40%	0.370 mL
APS(Ammonium persulfate) al 10%	50 µL	APS(Ammonium persulfate) al 10%	50 µL
TEMED,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	10 µL	TEMED,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	10 µL

Una vez realizadas ambas mezclas se procedió conforme a los siguientes pasos:

1. Montar vidrios
2. Llenar los vidrios anteriormente montados agregando primero la mezcla correspondiente del gel separador esperando 10 min a que polimerice para después agregar la parte correspondiente al gel concentrador aproximadamente 1.5 cm y colocar los peines.
3. Una vez polimerizado el gel, quitar los peines con cuidado y lavar los carriles con agua destilada.
4. Colocar el gel dentro de la minicámara vertical de electroforesis. Cubrir el gel con el buffer de corrida Tris-glicina IX.

5. Preparar la muestra agregando proporcionalmente la misma cantidad del buffer de carga 2x (Tris-HCl 100 mM pH 6.8, SDS 1%, 2-p-mercaptoetanol 4%, Coomassie Brilliant blue G 0.02% y Glicerol 24%) a la cantidad de la muestra.
6. Homogeneizar las muestras empleando un sonicador por 30 segundos
7. Mezclar las muestras homogéneamente por pipeteo.
8. Someter a ebullición por 5 min para desnaturalizar las proteínas y facilitar su migración.
9. Depositar las muestras en el gel corriendo inicialmente a 80V por 10 min, para que las muestras entren al gel y después incrementando a 100V hasta que el frente de corrida llegue al término del vidrio.

NOTA: Cubrir el gel con buffer de corrida Tris-glicina IX.

10. Una vez concluida la electroforesis, el gel se quita con cuidado y se coloca en la solución de tñido de azul de Coomassie durante toda la noche y posteriormente se deposita en la solución decolorante, dejándose por un par de horas hasta observar las bandas de interés.
11. Una vez decolorado el gel se coloca dentro del papel celofán dulce entre dos marcos de acrílico para secarlo.
12. Escanear y fotodocumentar.

7.8 Análisis estadístico

Con los resultados obtenidos se utilizó un diseño experimental estadístico completamente al azar en donde los datos de cuantificación fueron sometidos a un Análisis de Varianza (ANOVA) mediante el paquete de software estadístico SPSS versión 17.0 para determinar si existe diferencia significativa entre los métodos utilizados ($P < 0.05$), seguido por la prueba de comparación múltiple de Tuckey con un nivel de significancia menor al 5% para los análisis realizados.

8. RESULTADOS

8.1 Probióticos

8.1.1 Cinética de crecimiento: En las cinéticas de crecimiento de *L. casei* y *L. plantarum* en el medio de cultivo MPT para probióticos se observa una fase de adaptación durante las primeras dos horas de incubación. Posteriormente entre la hora 2 a 8 horas se presenta una fase de crecimiento logarítmico, y durante las siguientes horas alcanzando una máxima absorbancia de 1.5 nm a las 12 h de incubación, no se observó diferencia significativa entre la curva de crecimiento de *L. casei* y *L. plantarum* (Figura 7).

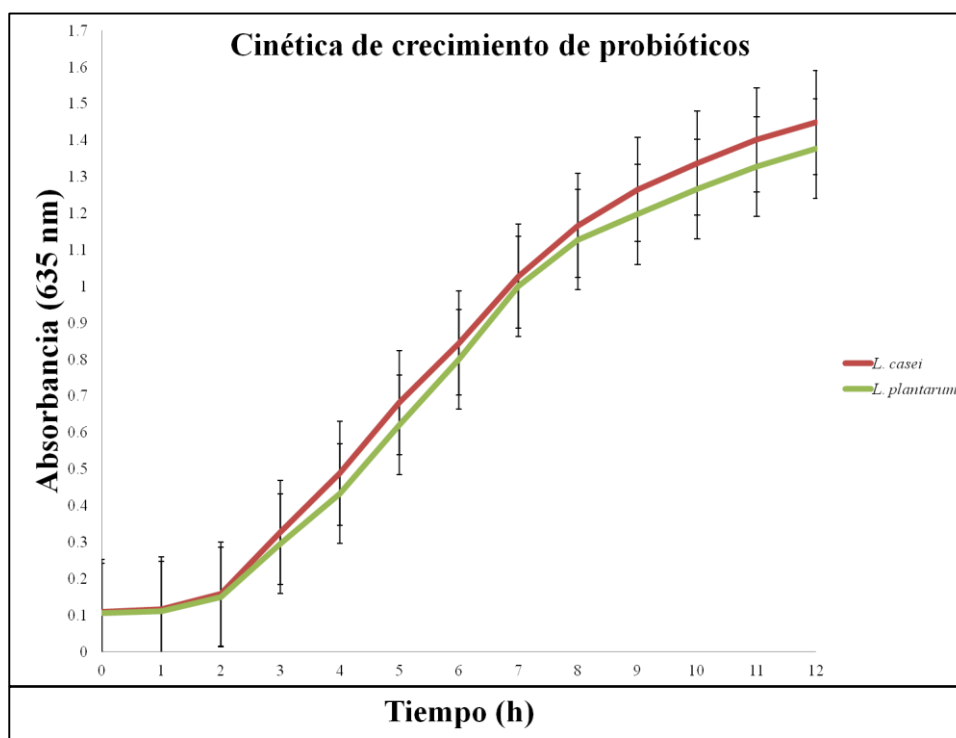


Figura 7. Cinética de crecimiento de probióticos (*L. casei* y *L. plantarum*). Esta cinética fue realizada empleando el medio MPT para probióticos. Cada punto representa el promedio de la lectura en tres eventos independientes por triplicado.

8.2 *Entamoeba histolytica*

8.2.1 Cinética de crecimiento: La cinética de crecimiento de *E. histolytica* (Figura 8) se realizó empleando el medio de cultivo MPT bajo condiciones axénicas *in vitro*. Se realizaron lecturas en cámaras Neubauer cada 24 h durante 6 días y se observó que durante las primeras 48 h se presentó una ligera fase de adaptación. En los siguientes dos días se observó una fase logarítmica, alcanzando su rendimiento máximo a las 96 h obteniendo un rendimiento de aproximadamente 200,000 cel/mL y después se observó la fase de muerte donde se observó una disminución paulatina en el número de células.

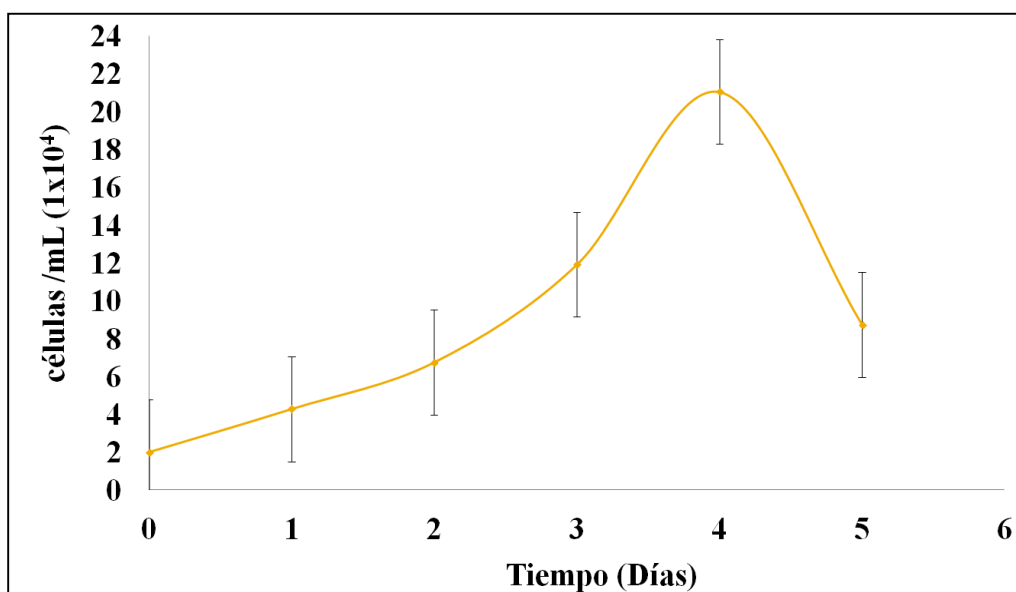


Figura 8. Cinética de crecimiento de *E. histolytica* bajo condiciones axénicas *in vitro*. Esta cinética fue realizada empleando el medio MPT. Los resultados obtenidos mostraron un rendimiento de aproximadamente 200,000 cel/mL que son el resultado de tres eventos independientes por triplicado.

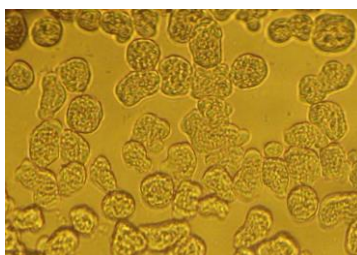


Figura 9. Morfología del trofozoíto de *E. histolytica*. En la imagen se observan trofozoítos que muestran el aspecto típico pleomórfico característico de esta fase de crecimiento. Observación realizada a 400X en microscopio óptico.

8.3. Obtención de postbióticos de *L. casei* /*L. plantarum* y determinar la actividad biológica sobre trofozoítos de *E. histolytica* HM1-IMSS.

Se obtuvieron los probióticos de *L. casei* y *L. plantarum* para evaluarse a diferentes concentraciones en la fase de trofozoíto. En las figuras 10 se muestra el rendimiento celular de trofozoítos obtenidos del bioensayo realizado.

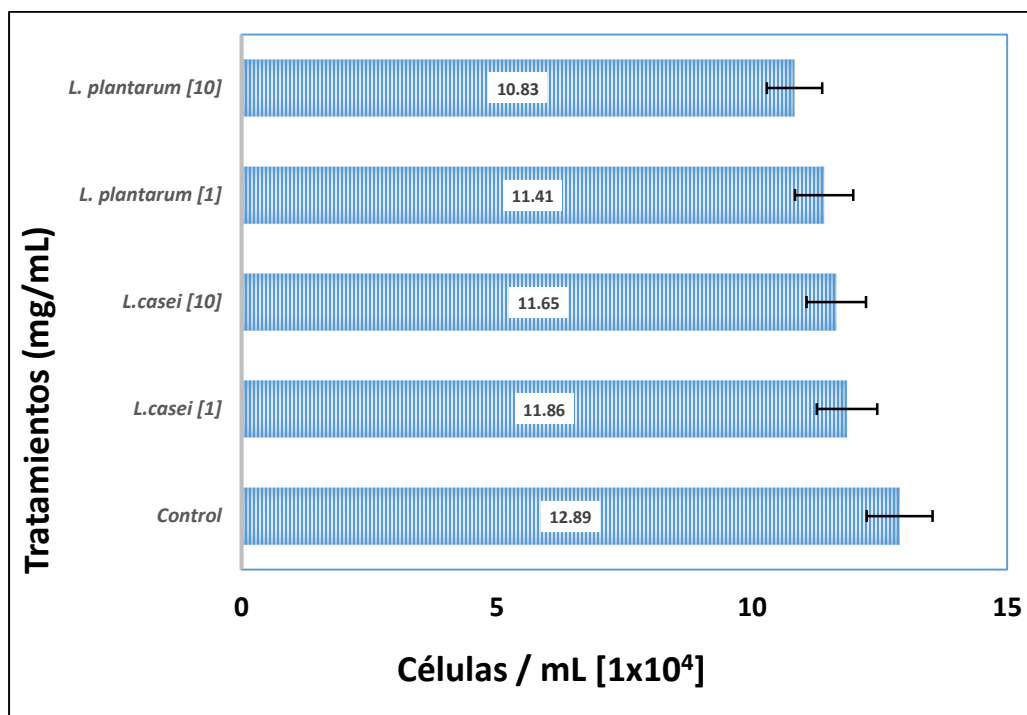


Figura 10. Rendimiento celular de trofozoítos de *E. histolytica* en presencia de postbióticos. Comparación del rendimiento celular de trofozoítos cultivados en presencia de liofilizado de postbióticos de *L. casei* y *L. plantarum* a las concentraciones de 1 y 10 mg/mL.

En la Figura 10 se muestra, de acuerdo al análisis estadístico mediante un análisis de varianza y una comparación de medias, que no existe diferencia significativa entre los diferentes tratamientos. Sin embargo, el tratamiento que presentó mayor inhibición de trofozoítos con respecto al control fue *L. plantarum* a 10 mg/mL.

8.4 Obtención de bacteriocinas a partir de postbióticos de *L. casei* y *L. plantarum* y análisis cualitativo

Previo a la obtención de los liofilizados de las bacteriocinas de cada probiótico, se realizó la determinación cualitativa de proteínas mediante una prueba de Biuret al dializado. Para determinar cualitativamente la presencia de proteínas en los dializados a partir de postbióticos de *L. casei* y *L. plantarum* se realizó la prueba de Biuret. En la Figura 11 se muestra la placa de porcelana con diferentes tonalidades de las reacciones, las cuales indicaron una reacción positiva para la presencia de proteínas (color violeta) para lo cual se empleó el suero bovino adulto, como control negativo se empleó el medio de cultivo de probióticos. Se obtuvieron las bacteriocinas a partir de los postbióticos de *L. casei* (Lc) y de *L. plantarum* (Lp) en los cuales se observó una reacción positiva para la presencia de proteínas. Posteriormente el dializado conteniendo bacteriocinas se almacenó a 4 °C hasta el momento de su uso.

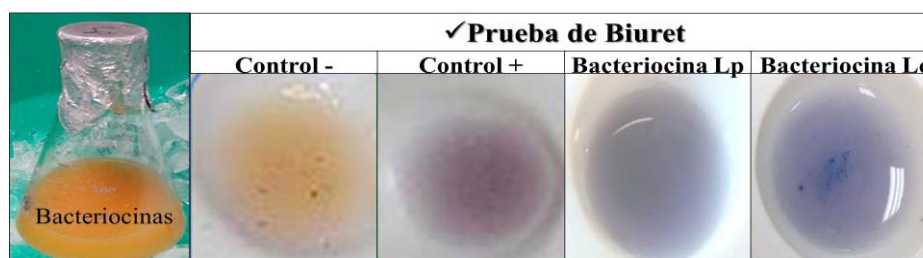


Figura 11. Prueba de Biuret para la determinación cualitativa de proteínas a los dializados de *L. casei* y *L. plantarum*. Control – (Medio MPT) y Control + (Suero bovino adulto).

Posteriormente se liofilizó el dializado de proteínas y se almacenó a 4°C para realizar bioensayos sobre actividad biológica sobre los cultivos de *E. histolytica*.

8.5 Evaluación de la actividad biológica de las bacteriocinas de *L. casei* y *L. plantarum* sobre trofozoítos de *E. histolytica* HM1-IMSS

Se evaluaron las bacteriocinas de *L. plantarum* y de *L. casei* sobre el crecimiento axénico *in vitro* de *E. histolytica* a las dosis de 0.1, 0.3 y 0.5 mg/mL, además se empleó la bacteriocina comercial nisina y también se empleó una mezcla de las bacteriocinas de *L. casei* y *L. plantarum*, en la Figura 12 se muestra el rendimiento de trofozoítos

obtenido de cada uno de los tratamientos, los cuales se describen a continuación: la barra morada representa el control con un valor de 75,800, las barras verdes representan las células obtenidas en presencia de las bacteriocinas de *L. plantarum* a diferentes dosis, observando inhibición significativa con respecto al control sólo a la concentración de .3 mg/mL en la cual se obtuvieron 51300 cel/mL, en las barras de color anaranjado se muestran las células obtenidas en presencia de la bacteriocina de *L. casei* a diferentes concentraciones observando inhibición significativa con respecto al control a las dosis de 0.1 y 0.5 mg/mL obteniendo un rendimiento de 36,000 y 48998 cel/mL respectivamente, en las barras en color ámbar se observa inhibición significativa por parte de la bacteriocina comercial “nisina” a las dosis de 0.1, 0.3 y 0.5 mg/mL obteniendo un rendimiento de 18500, 16732 y 9322 cel/mL. En la barra roja se observa la marcada inhibición que se observa al evaluar la sinergia de las bacteriocinas de *L. casei* y *L. plantarum* a la dosis de 0.5 mg/mL.

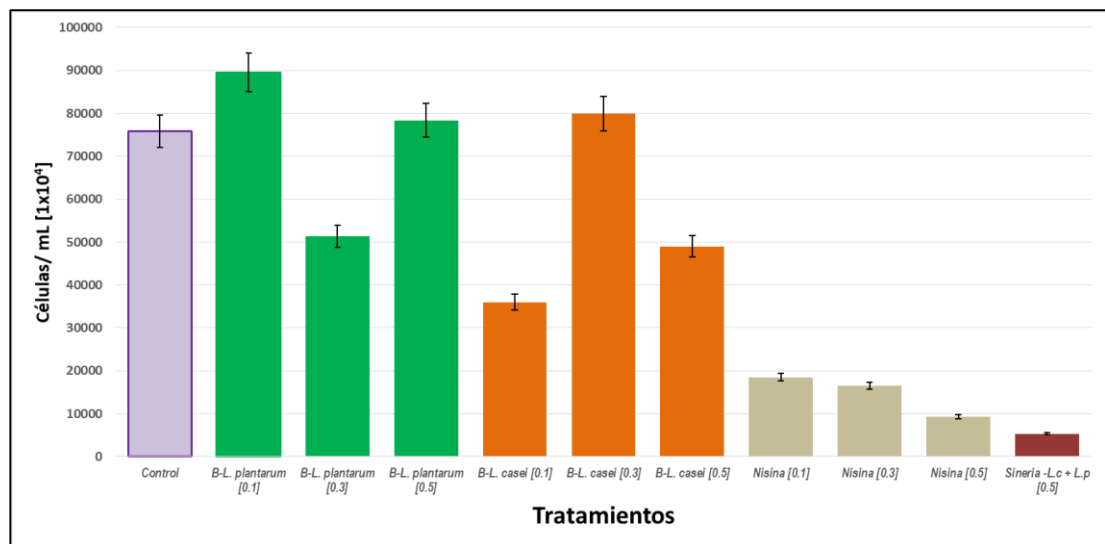


Figura 12. Rendimiento celular de trofozoítos de *E. histolytica* cultivados en presencia de bacteriocinas de *L. plantarum* (barras verdes), bacteriocinas de *L. casei* (barras naranjas), Nisina (barras ámbar) y la sinergia de bacteriocinas de *L. casei* + *L. plantarum* (barra roja). (Autoría propia).

Esta sinergia de bacteriocinas de lactobacilos presenta mayor inhibición con respecto a todos los tratamientos antes mencionados ya que sólo se obtuvo un rendimiento de 5395 cel/mL, lo cual representa una inhibición del 93.01 % mayor a la inhibición ocasionada por la nisina a la misma concentración [0.5 mg/mL] la cual fue de 87.73%, no se observa diferencia entre los porcentajes de inhibición obtenidos entre la sinergia de bacteriocinas y la nisina a la concentración de 0.5 mg/mL.

El aspecto de los cultivos se muestran en la Figura 13. En el cual se observa el aspecto típico pleomorfo de los trofozoítos de *E. histolytica* en la imagen control, en el cultivo cultivado en la sinergia de las bacteriocinas de lactobacillus se observan muy escasas células que tienden a ser redondeadas.

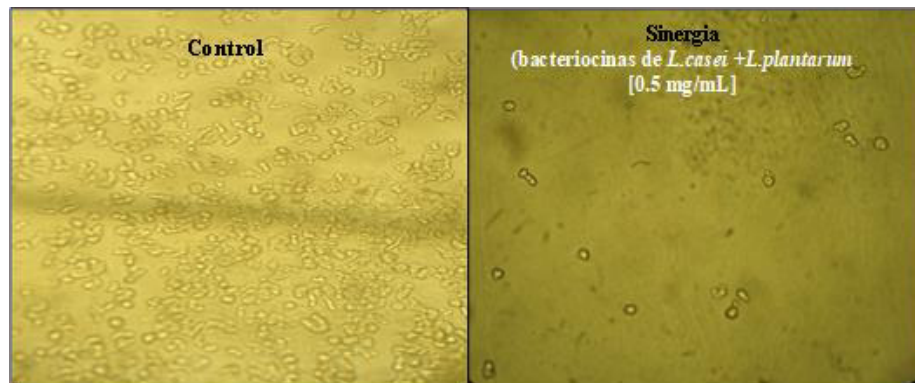


Figura 13. Aspecto de los cultivos de *E. histolytica* control y cultivados en presencia de bacteriocinas de *L. casei* y *L. plantarum*, observaciones realizadas al microscopio óptico (400X).

8.6 Encapsulación

8.6.1 Microencapsulación: La Figura 14 muestra el dispositivo microfluídico utilizado para formar las plantillas de doble emulsión y su etapa de formación. El alto control sobre las relaciones de flujo permite la formación de gotas de doble emulsión altamente monodispersas, que se convierten en vesículas lipídicas unilamelares monodispersas.

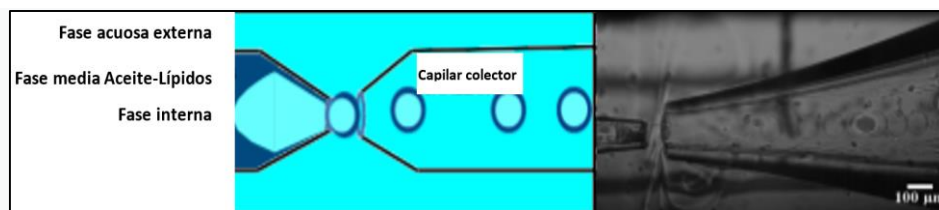


Figura 14. Dispositivo para realizar la microencapsulación de postbióticos.

La Figura 15 muestra una vesícula lipídica que contiene en su núcleo los postbióticos al 5% vol/vol, la vesícula lipídica fue teñida con sal de fluoresceína sódica (FSS), posteriormente se obtuvo una micrografía usando una fuente de excitación LED de 365 nm de longitud de onda, observada 25 días después de la formación.

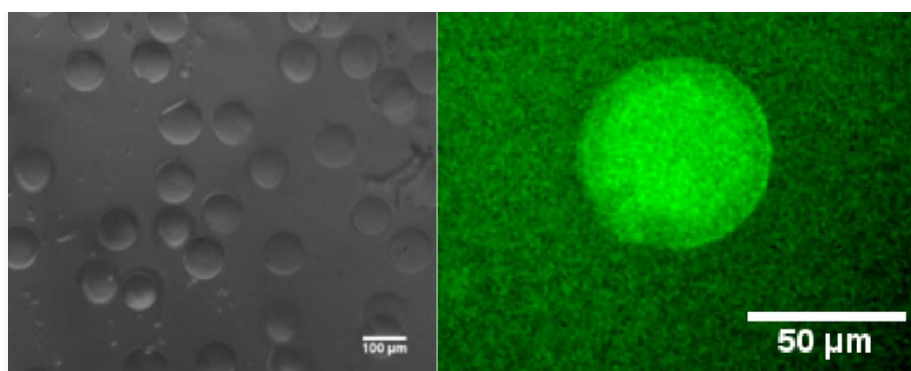


Figura 15. Micrografía que muestra la vesícula lipídica conteniendo postbióticos al 1% vol/vol (a), vesícula lipídica que contiene postbióticos teñidos con FSS y excitación LED de 365 nm.

Los resultados mostraron algunas de las posibilidades que pueden ser explotadas por la técnica microfluídica. Demostramos que la encapsulación de una solución acuosa con baja viscosidad como medio de crecimiento de los probióticos se puede lograr aumentando la relación de flujo de la fase externa en los dispositivos microfluídicos. Sin embargo estas vesículas lipídicas se decidió no emplearlas en este estudio debido a que disminuye el rendimiento de los cultivos amibianos.

8.6.2 Encapsulación de bacteriocinas de liberación controlada empleando alginato de sodio:

La encapsulación es una tecnología de cápsulas selladas que pueden liberar sus contenidos a velocidades controladas bajo condiciones específicas. En este trabajo se produjo encapsulados de bacteriocinas para analizar su liberación controlada sobre trofozoítos de *E. histolytica* HM1-IMSS mediante un modelo *in vitro*. Lo primero que se diseñó fueron cápsulas de alginato de sodio por la técnica de gelificación, en la Figura 16, se observa el aspecto de las cápsulas de alginato producidas, esta técnica nos permite elaborar cápsulas de diversos diámetros, para la elaboración de estas cápsulas se emplearon jeringas para insulina, aguja 30Gx13mm (1/2”), el diámetro de las cápsulas fue de 1.5 mm.

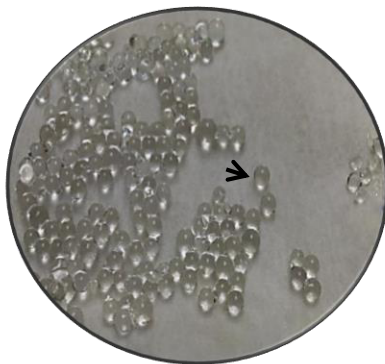


Figura 16. Aspetto general de las microcápsulas de alginato obtenidas por gelificación.

8.6.3 Impacto biológico de las cápsulas de alginato sobre los cultivos de trofozoítos de

E. histolytica: Las capsulas fueron colocadas en los cultivos axénicos *in vitro* por tres días a 37°C para descartar posible actividad inhibitoria sobre el cultivo amibiano, posteriormente fueron determinadas las cel/mL de trofozoítos de cultivos en presencia de cápsulas de alginato y cultivos control, los resultados se muestran en la Figura 17.

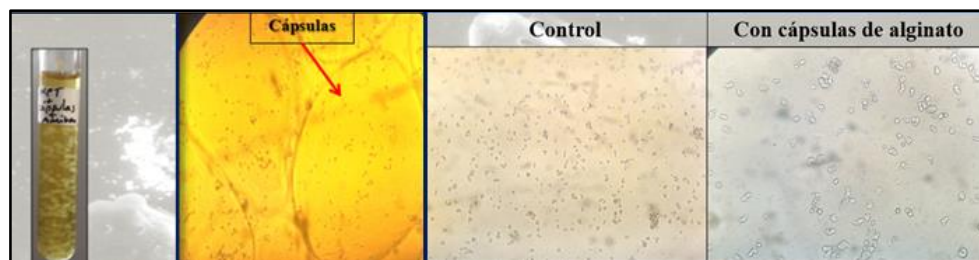


Figura 17. En la imagen a) se observa un cultivo amibiano en presencia de cápsulas de alginato, en b) imagen obtenida al invertoscopio en el cual se aprecia la interacción de los cultivos amibianos y las cápsulas de alginato, en c y d) imágenes tomadas al invertoscopio en los cuales se aprecian los cultivos amibianos. (400X).

El rendimiento celular de trofozoítos de *E. histolytica* en presencia de cápsulas de alginato se muestra en la Figura 18 En la cual se obtuvieron 94,758 cel/mL en el cultivo axénico *in vitro* de *E. histolytica*, cuando al cultivo se le agregaron las cápsulas de alginato y después de tres días de incubación se obtuvo un rendimiento de 95,937 cel/mL, estos rendimientos no presentan diferencia estadística significativa.

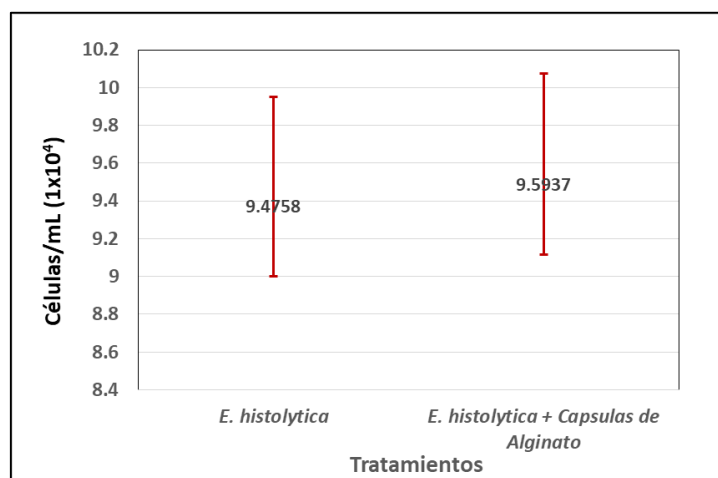


Figura 18. Comparación del rendimiento de *E. histolytica* control y en presencia de alginato. No se observa diferencia significativa.

8.6.4 Evaluación de la capacidad para liberación de bacteriocinas: En la Figura 19 se muestra la cinética de liberación del contenido de las cápsulas conteniendo bacteriocinas+azul de Coomassie en donde se observó que a las 7 h la absorbancia es de 0.137 nm. Se observa que en la primera hora se libera la mayor cantidad de bacteriocinas+azul de Coomassie.

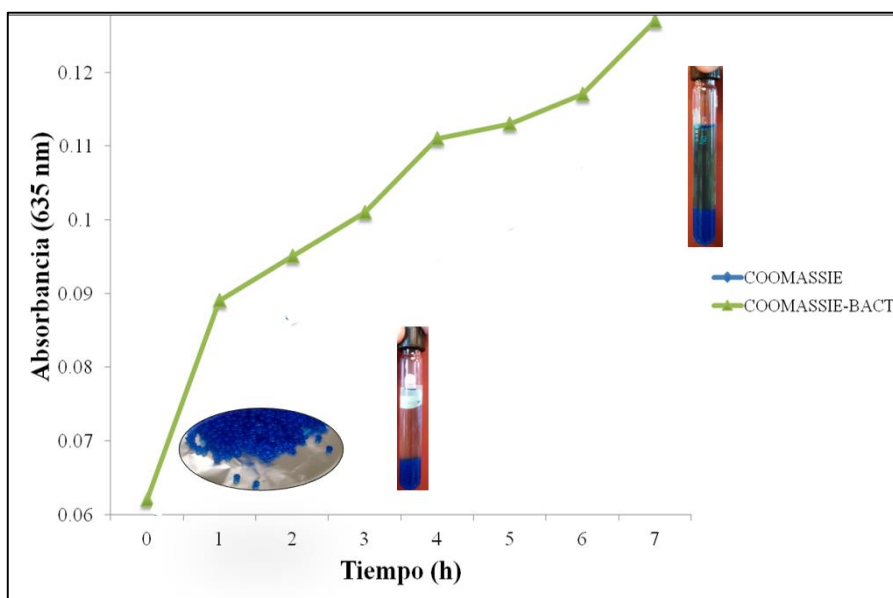


Figura 19. Cinética de liberación de azul de Coomassie+ bacteriocinas.

En la prueba de digestión artificial los resultados se muestran en la Figura 20 se observó que las cápsulas son resistentes desde pH 2.01 hasta pH=7.7, sin embargo a pH=8.5 comienzan a disgregarse. Es importante observar que la capsula libera el total de su contenido a pH=7 a 24 h, ya que las cápsulas se observan translúcidas, a diferencia del contenido azul comassie+bacteiocinas que se aprecian al interior de las cápsulas a pH=2 por un lapso de 3 h, así como a pH=3.5 por un lapso de 4 h y a pH=7 por 4 h, se observa que se liberó completamente el contenido, ya que las capsulas se observan translúcidas. A pH=7.7 por 24 h aún se encuentra íntegra la estructura de la capsula de alginato, pero a pH=8.5 por 24 h la capsula se disgrega, el pH al que se evaluó la liberación y resistencia de la cápsula a determinada concentración de alginato, se evaluaron de acuerdo al pH propio del sistema digestivo por el cual atravesará la capsula una vez que sea ingerida.

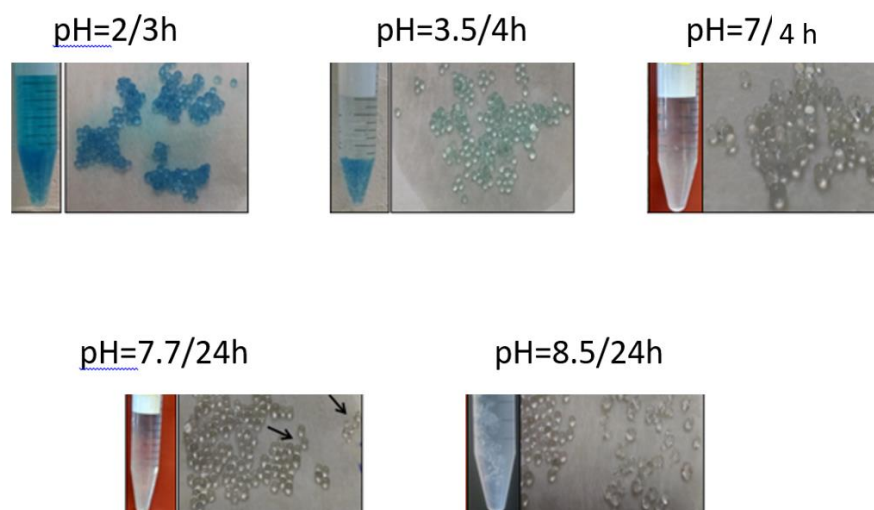


Figura 20. Evaluación de la liberación de bacteriocinas a pH específico.

8.6.5 Evaluación de la bacteriocina Nisina® encapsulada y actividad biológica sobre el cultivo de trofozoíto de *E. histolytica* HM1-IMSS: La droga de elección para el tratamiento de la amibiasis es el metronidazol y sus derivados imidazólicos (albendazol), sin embargo presentan efectos secundarios indeseables en el humano. Por ello se buscan alternativas terapéuticas para su tratamiento, empleando diversos metabolitos secundarios como lo son las bacteriocinas (péptidos con efectos bactericidas). Se evaluó *in vitro* la actividad anti-amibiana de capsulas de alginato conteniendo metronidazol, albendazol y la nisina (bacteriocina comercial grado alimenticio), se prepararon capsulas con un contenido de cada anti-amibiano a una concentración de 1 mg/mL por medio de cultivo axénico *in vitro* de *E. histolytica*. Los resultados se muestran en la Figura 21.

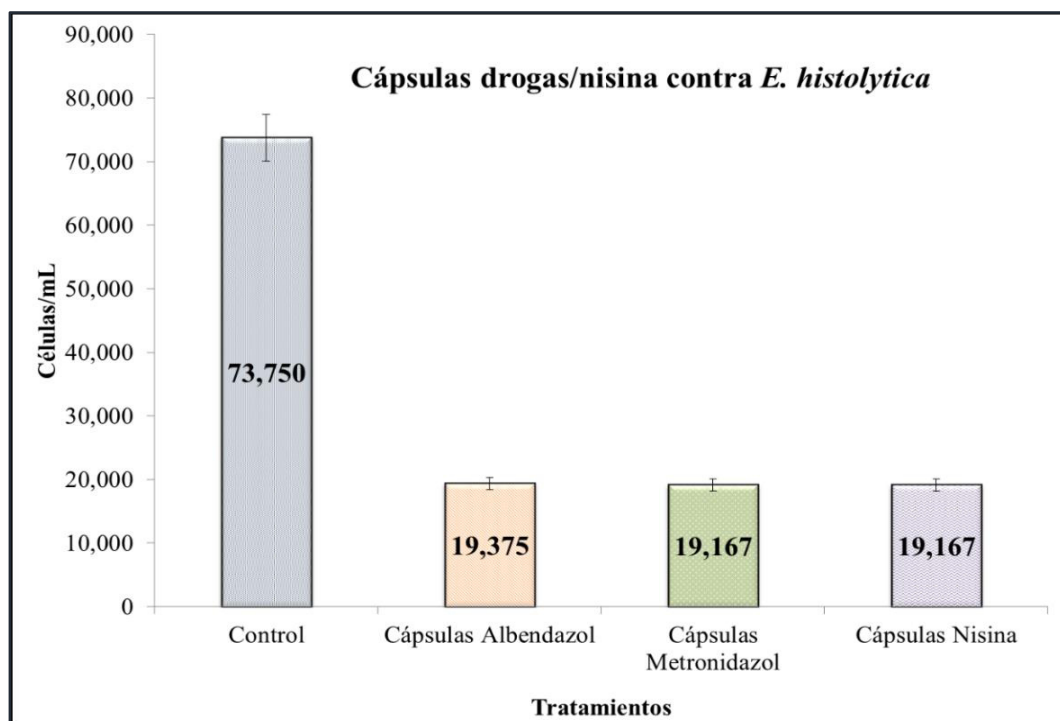


Figura 21. Rendimiento celular de trofozoítos de *E. histolytica* en presencia de cápsulas albendazol, metronidazol y nisina [1 mg/mL]

En la Figura 22 se observan las imágenes tomadas al invertoscopio el aspecto de los cultivos de *E. histolytica* en presencia de los encapsulados conteniendo los diversos fármacos (albendazol y metronidazol) y bacteriocinas evaluadas. Se observa en los tres tratamientos solo restos celulares o detritus de los trofozoítos de *E. histolytica*, inducida por los diversos mecanismos de cada uno de estos tratamientos.

Por otra parte, también se prepararon capsulas conteniendo la mezcla de bacteriocinas (sinergia de bacteriocinas de *L. casei*+*L. plantarum*) así como postbióticos encapsulados, ambos tratamientos fueron preparados para que tuvieran una liberación de bacteriocinas y se distribuyeran en el medio a una concentración de 1 mg/mL, el rendimiento celular se muestra en la Figura 23.

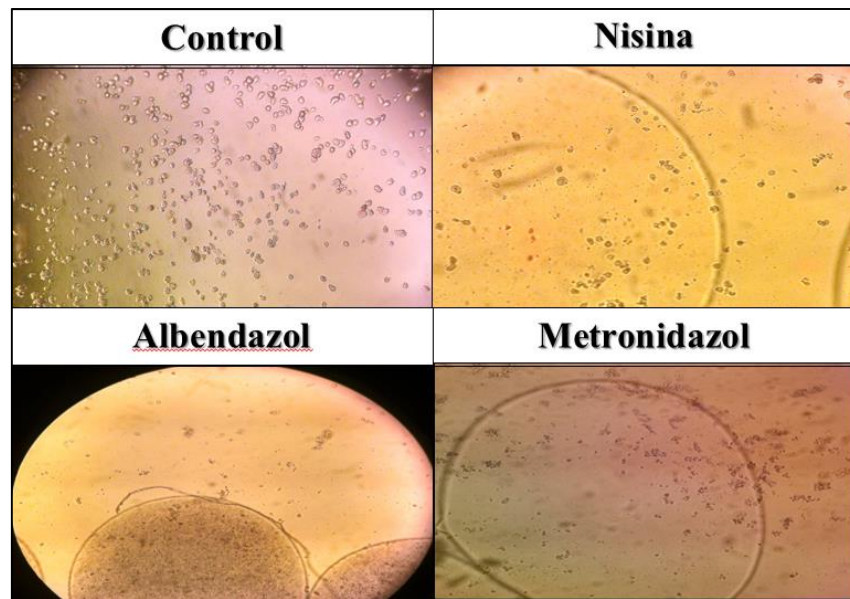


Figura 22. Aspecto de los cultivos de *E. histolytica* en presencia de Nistatina, albendazol y metronidazol, observaciones realizadas al invertoscopio a 400X.

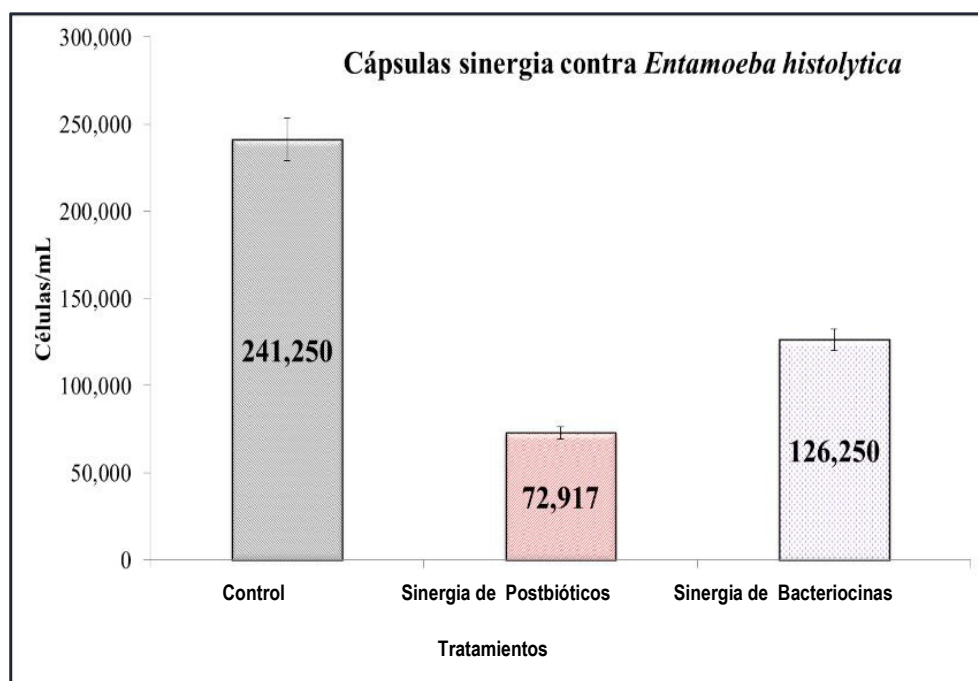


Figura 23. Rendimiento celular de trofozoítos de *E. histolytica*. a) en presencia de cápsulas conteniendo la sinergia de los postbióticos (*L. casei* + *L. plantarum*) y bacteriocinas a una concentración de 1 mg/mL e incubadas a 37 °C/ 72 h.

En este trabajo, se observó que las cápsulas de sinergia de postbióticos presentaron una inhibición del 70% y la sinergia de bacteriocinas mostraron una actividad anti-amibiana del 48%, sin embargo, los demás tratamientos con cápsulas de albendazol, metronidazol y nisina presentaron una inhibición de aproximadamente un 74%. (Figura 24).

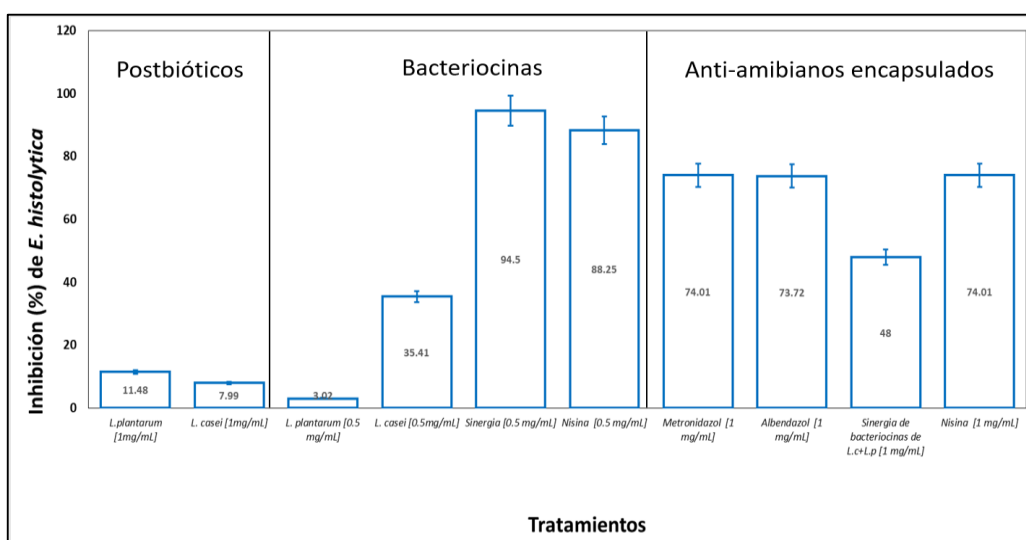


Figura 24. Comparación de la actividad anti-amibiana de los postbióticos, bacteriocinas y bacteriocinas encapsuladas de *L. plantarum* y *L. casei*.

De acuerdo a los resultados observados en la Figura 24 y Tabla 1, se observa que la sinergia de bacteriocinas de *L. plantarum* + *L. casei* presentó la mayor actividad anti-amibiana con un 94.5% de inhibición, el encapsulado de sinergia de las bacteriocinas inhibió un 48%, los fármacos anti-amibianos (metronidazol y albendazol) encapsulados presentaron un 74 y 73.7% de inhibición respectivamente y la nisina encapsulada también inhibió el crecimiento de *E. histolytica* en un 74.01%, valor semejante al observado con las drogas anti-amibianas, no presentando diferencia significativa entre estos tres tratamientos encapsulados, pero sí presentan diferencia significativa con respecto a la sinergia de las bacteriocinas encapsuladas.

Tabla 1

Cuadro comparativo en donde se muestra la actividad anti*amibiana* de los postbióticos, bacteriocinas y bacteriocinas encapsuladas de *L. plantarum* y *L. casei*.

Condición de Evaluación	Tratamiento	Concentración (mg/mL)	Inhibición (%)
Postbiótico	<i>L. plantarum</i>	1	11.48
	<i>L. casei</i>	1	7.99
Bacteriocinas	<i>L. plantarum</i>	0.5	3.02
	<i>L. casei</i>	0.5	35.41
	Sinergia bacteriocinas de <i>L. casei</i> + <i>L. plantarum</i>	0.5	94.5
	Nisina	0.5	88.25
Capsulas	Metronidazol	1	74.01
	Albendazol	1	73.72
	Sinergia de bacteriocinas de <i>L. casei</i> + <i>L. plantarum</i>	1	48
	Nisina	1	74.01

También es importante observar el incremento en la inhibición de los cultivos de *E. histolytica* de la sinergia de los postbióticos de *L. casei* + *L. plantarum*, se observa que al ser evaluadas las bacteriocinas de *L. casei* sólo inhibió un 35.41% y las bacteriocinas de *L. plantarum* sólo inhibió un 3.02%, ambas bacteriocinas se evaluaron a 0.5 mg/mL, cabe recalcar que a otras concentraciones evaluadas (menores) presentan mayor actividad anti*amibiana* y esta actividad no es proporcional a la concentración.

8.7 Caracterización al MFA el impacto de las bacteriocinas sobre la membrana celular de trofozoítos de *E. histolytica*

En este trabajo se produjeron encapsulados de bacteriocinas obtenidas de las bacterias *Lactobacillus casei* y *L. plantarum*, se evaluó su efecto sobre trofozoítos de *E. histolytica* mediante un modelo *in vitro* y se caracterizaron las alteraciones morfológicas mediante microscopía de fuerza atómica. Los parámetros determinados fueron: altura, rugosidad, ancho y longitud (Tabla 2), los resultados que se muestran son el promedio de tres eventos independientes por triplicado. Para realizar el análisis morfológico y comparar posibles alteraciones a nivel de membrana del trofozoíto de

E. histolytica, se analizó: a) trofozoítos control y b) trofozoítos cultivados en presencia de la sinergia de bacteriocinas de *L. casei* y *L. plantarum* [0.5 mg/mL].

Tabla 2

Análisis de características morfométricas de trofozoítos de *E. histolytica* cultivado en presencia de la sinergia de bacteriocinas de *L. casei*+*L. plantarum*

Parámetros	Trofozoíto (Control)	Trofozoíto (Sinergia de bacteriocinas <i>L. casei</i> + <i>L. plantarum</i>)
Rugosidad(nm)	216	461
Altura (μm)	1.83	3.22
Ancho (μm)	56.2	25
Longitud (μm)	69	33

De acuerdo a los valores obtenidos (Tabla 2 y Figuras 25) se pueden interpretar como que la célula pierde su forma plana, ya que tiende a incrementar la altura significativamente y es una célula más estrecha significativamente y menos alargada, y la longitud se observa disminuida significativamente, lo cual nos hace pensar que la célula tiende a redondearse o tomar una forma esférica, lo cual se puede corroborar con el aspecto de la célula en la imagen 3D de la Figura 26 a, esta morfología es típica de un cultivo amibiano alterado y no viable.

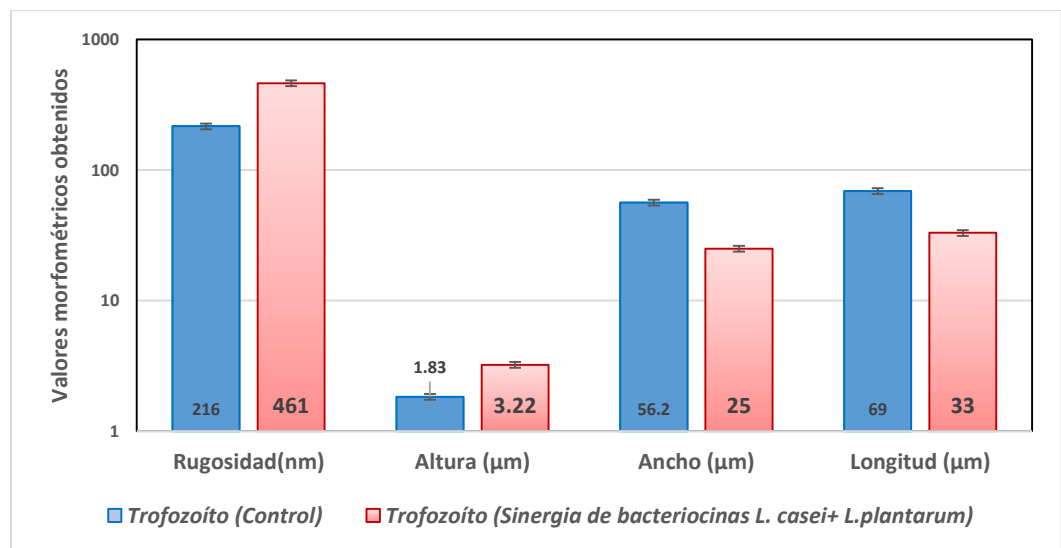


Figura 25. Análisis comparativo del análisis morfométrico de *E. histolytica* cultivado en presencia de bacteriocinas de *L. casei* + *L. plantarum* tomando como referencia los valores morfométricos de un cultivo control.

En la imagen de altura en el trofozoíto control se observan zonas claras (corresponde a zonas más altas) la cual alcanza una altura de 3.657 μm el pico o zona más elevada y el trofozoíto control presenta la zona más elevada a una altura de 5.912 μm , en la imagen del trofozoíto control también se observan zonas oscuras, lo cual representa la zona más profunda, esto no se observa en el trofozoíto del tratamiento con bacteriocinas, en cuanto a la magnitud nos indica la composición de la membrana celular, la cual se aprecia relativamente uniforme en los bordes de la periferia del trofozoíto control (el cual puede corresponder al periplasma) y en el centro puede corresponder a la zona vacuolar, en cuanto a la magnitud (composición celular) en la imagen del trofozoíto testigo se observa un aspecto o magnitud muy diferente al control, lo cual nos indica que la composición de la membrana no es igual en ambos casos; en la imagen en 3D nos permite apreciar en la imagen del trofozoíto control el aspecto típico pleomórfico de los trofozoítos, es decir que no tiene una forma específica, además se observan ciertas protuberancias las cuales corresponden a pseudópodos, y en el trofozoíto en tratamiento no presenta estos pseudópodos, se observa principalmente con un aspecto esférico (Figura 26a y b).

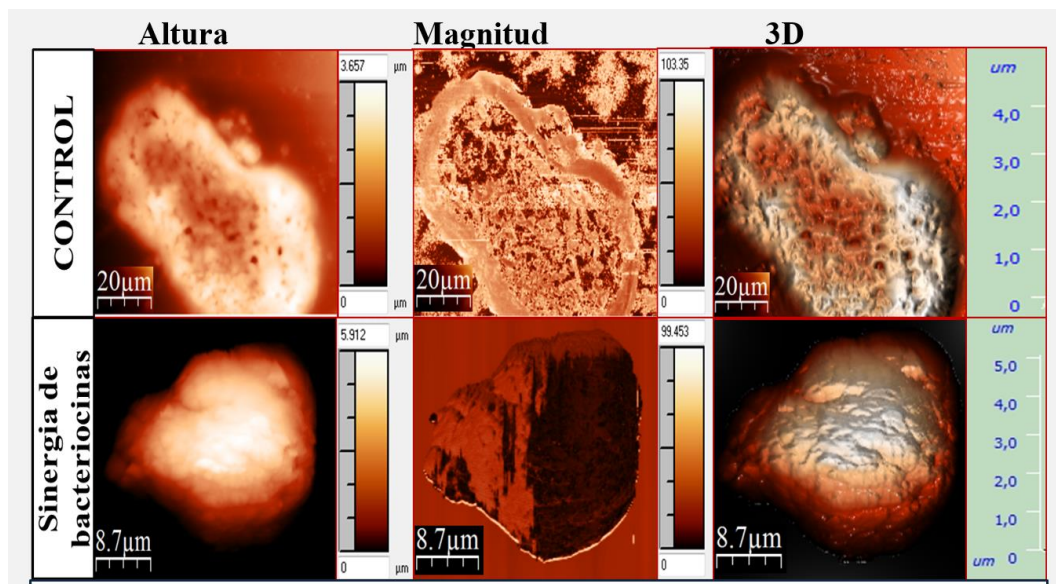


Figura 26a. Análisis comparativo al AFM de trofozoítos de *E. histolytica* control y en presencia de encapsulados de sinergia de bacteriocinas de *Lactobacillus* sp.

Control

Sinergia de bacteriocinas

(*L. casei* + *L. plantarum*)

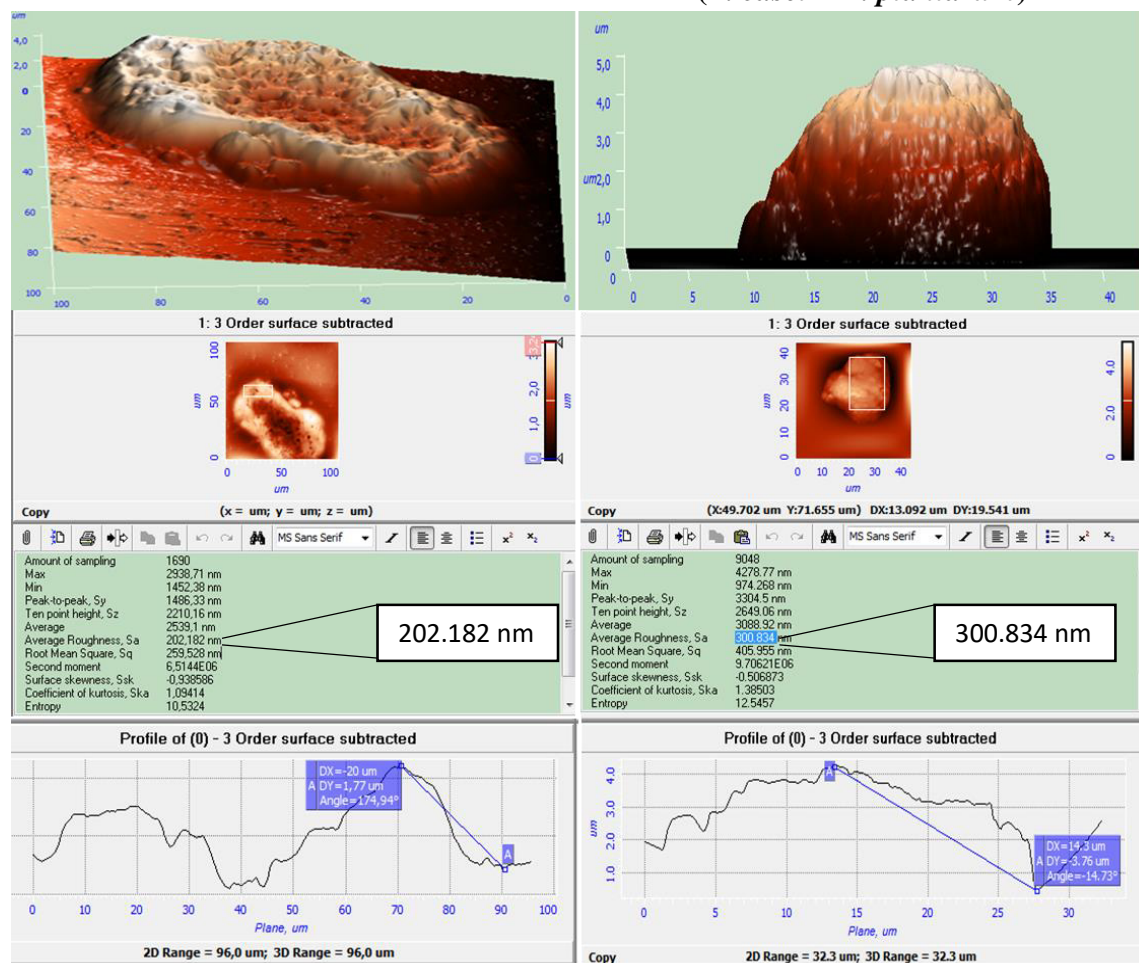


Figura 26b. Análisis comparativo al AFM de trofozoitos de *E. histolytica* control y en presencia de encapsulados de sinergia de bacteriocinas de *Lactobacillus* sp.

8.8 Análisis electroforético comparativo (SDS-PAGE) de los componentes proteicos de trofozoitos de *E. histolytica* en presencia de bacteriocinas de *L. casei* + *L. plantarum*.

El análisis electroforético en geles de poliacrilamida de las proteínas se basa en la separación de éstas de acuerdo a su peso molecular, en la Figura 27. Se observa al marcador de proteínas (M) con un rango de peso molecular de 14 a 200 kDaltones (kDa), en A se muestra el patrón de proteínas de trofozoitos obtenidas de un cultivo axénico *in vitro* (control), se observan gran cantidad de bandas de proteínas que presentan un peso molecular entre 30 y 50 kDa, otro grupo de bandas protéicas muy

marcadas se observan entre 60 a 140 kDa aproximadamente, se observa el mismo patrón el gel SDS-PAGE de referencia.

En el carril B, se muestran las bandas de proteínas que se obtuvieron de trofozoítos cultivados en presencia de la sinergia de bacteriocinas de *L. casei* + *L. plantarum*, se observa marcada inhibición en el bandeo protéico con respecto al control, los bandeos que se ven muy disminuidos son: de 18, 31, 37-43 y entre 50 a 120 kDa; estas bandas protéicas probablemente correspondan a enzimas necesarias para diversos procesos metabólicos, pero también pueden corresponder a enzimas líticas tipo cistein-proteasas (Figura 27).

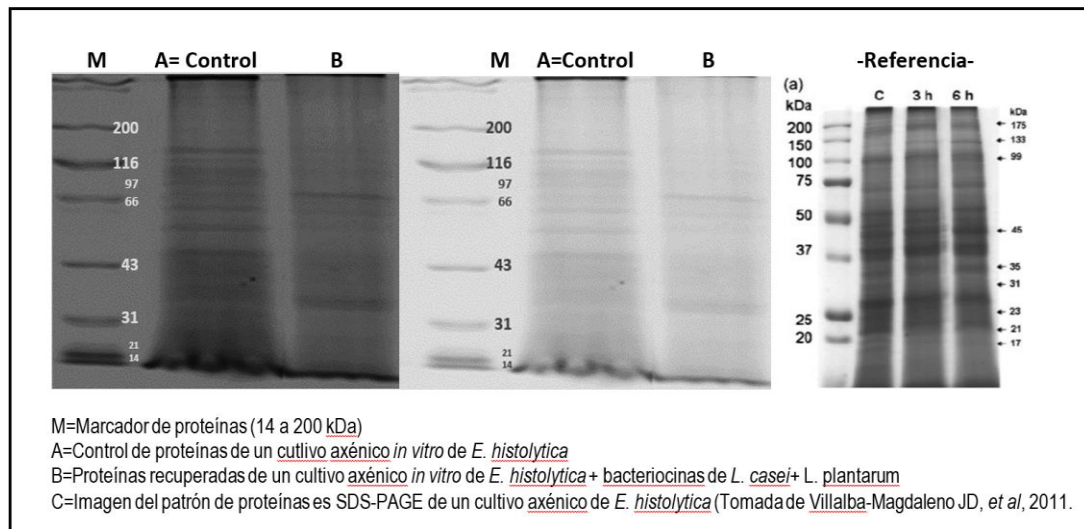


Figura 27. Comparación del patrón electroforético de proteínas totales de *E. histolytica* cultivado en presencia de bacteriocinas de *Lactobacillus* sp.

9. DISCUSIÓN

La amibiasis es definida por la Organización Mundial de la Salud como la infección provocada por *E. histolytica* con o sin manifestaciones clínicas. Este parásito protozoario tiene una distribución cosmopolita, representa la tercera causa de muerte por parásitos protozoarios a nivel mundial y presenta una prevalencia alta en países donde predominan condiciones socioeconómicas y sanitarias deficientes.

En México es uno de los principales problemas de salud pública por su frecuencia, mortalidad y fácil dispersión. La OMS la cataloga en el grupo de “Enfermedades infecciosas olvidadas” debido a pocos estudios que se realizan al respecto. De acuerdo al Instituto Nacional de Estadística y Geografía (SINAVE, 2019), la amibiasis intestinal ocupó el séptimo lugar como causa de morbilidad por casos nuevos, reportando 80,631 mujeres y 65,282 hombres con amibiasis intestinal, y casos de AHA (absceso hepático amibiano) se reportaron 227 casos en mujeres y 348 casos en varones, estos valores son acumulados hasta septiembre de 2019 (<https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/501186/sem40.pdf>). (accesado 18-oct-2019)

E. histolytica posee dentro de su ciclo de vida dos fases o estadios: la fase móvil e infestiva denominada trofozoíto y una estructura de latencia o de resistencia llamada quiste, la cual se caracteriza por estar cubierta con una pared de quitina (CDC, 2019). <https://www.cdc.gov/dpdx/amebiasis/index.html> (accesado 03-oct-2019)

Para el tratamiento de la amibiasis y sus múltiples manifestaciones clínicas ocasionada por *E. histolytica*, la droga de elección es el metronidazol, sin embargo este fármaco presenta múltiples efectos secundarios indeseables en el humano como meteorismo, daño en el AND ocasionando daños citotóxicos, citogénicos y neurotóxicos (Shennan et al. 2006) y además existen reportes recientes de que este protozoario parásito presentan resistencia a esta droga (Barrón, 2008).

Debido a la importancia médica que posee esta enfermedad, se ha vuelto necesario tener un mayor entendimiento de los mecanismos de la actividad parasitaria de *E. histolytica* y su interacción con diferentes compuestos químicos y/o naturales. Como ya se

mencionó, la droga de elección es el metronidazol y sus derivados imidazólicos, sin embargo presentan efectos secundarios indeseables en el humano². Por ello se buscan alternativas terapéuticas para su tratamiento, como los metabolitos secundarios de plantas, algas y recientemente, bacteriocinas (péptidos con efectos bactericidas y espectros particulares de inhibición). Actualmente se trabaja en la búsqueda de metabolitos que inhiban el proceso de infestación (fase de trofozoíto), o bien que inhiban la inducción de la formación del quiste, la cual es considerada la fase de resistencia.

Recientemente se ha reportado una gran variedad de microorganismos resistentes a las drogas de elección, entre las cuales se encuentra *E. histolytica*. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha encomendado la búsqueda de nuevas drogas, teniendo como punto de referencia el empleo de microorganismos que presenten interferencia microbiana sobre microorganismos patógenos. La FAO y la OMS han declarado que existe evidencia científica para indicar el potencial de los probióticos que proporcionan beneficios a la salud y son seguras para uso humano (FAO/OMS 2002).

En la búsqueda de alternativas terapéuticas para inhibir la proliferación de microorganismos patógenos al humano se ha recurrido al estudio de una gran diversidad de microorganismos, principalmente bacterias y sus metabolitos, a lo que se le conoce como terapia de interferencia microbiana o Microbial Interference Therapy (MIT) (Falagas et al. 2008). Entre los microorganismos empleados para este propósito están los probióticos. Los probióticos fueron definidos en 2002 como microorganismos vivos que confieren beneficios a la salud del huésped cuando son administrados en cantidades adecuadas. Esta definición fue consensada por el comité de expertos de la Organización para la Agricultura y la Alimentación (Food and Agriculture Organization) de las Naciones Unidas y por la OMS (FAO/WHO, 2002); sin embargo, en 2014 el grupo de expertos reunidos por ISAPP (International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics) publicaron el Marco general sobre el uso y alcance apropiados del término probiótico, este consenso indica que se requiere evidencia de un beneficio de salud, ya sea a nivel de grupo o específico de la cepa, según la naturaleza del beneficio.

Los probióticos pueden tener diferentes medios de administración, especies objetivo (humanos y animales), poblaciones objetivo, sitios objetivo (intestino y más allá), puntos

finales de eficacia y categorías reguladoras. Todos los probióticos deben ser seguros para su uso previsto. Los microbios muertos, los productos y componentes microbianos no están incluidos en la clasificación de probióticos (Hill et al. 2014).

Los productos microbianos producidos por los probióticos reciben el término de postbióticos, metabióticos, biogénicos o metabolitos/SFC (sobrenadantes libres de células), secretados por bacterias vivas o liberados después de la lisis bacteriana (Aguilar et al. 2018). Estos subproductos pueden contener ácidos grasos de cadena corta (SCFA, por sus siglas en inglés), enzimas, péptidos, ácidos teicoicos, muropéptidos derivados de peptidoglicanos, endo y exopolisacáridos, proteínas de la superficie celular, vitaminas, plasmalógenos y ácidos orgánicos (Tsilingiri and Rescigno 2013). Estos subproductos ofrecen beneficios fisiológicos al huésped al proporcionar bioactividad adicional (Cicenia et al. 2016).

Entre los microorganismos probióticos más comunes con beneficios de salud para los seres humanos destacan los siguientes géneros: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Saccharomyces*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Bacillus* y la especie *Escherichia coli* (Fijan 2014).

En diversos trabajos se ha demostrado la actividad antibacteriana o también llamada interferencia microbiana (IM) que presentan los metabolitos extracelulares producidos por diversas bacterias ácido lácticas. En un trabajo reciente (Rishi et al. 2011) reportaron los efectos de un extracto libre de células obtenido de *L. plantarum* y del cotrimazol, sobre el crecimiento de *Salmonella typhimurium* NCTC 74, el grupo investigadores concluyeron que el sinergismo del extracto libre de células (80 AU/mL)-cotrimazol (2µg/mL) genera una interferencia microbiana, reduciendo el crecimiento de *S. typhimurium* en un 50%, y que los tratamientos evaluados de manera independiente presentan porcentajes menores al 25%, con lo anterior, ellos proponen una alternativa médica para el tratamiento de la salmonelosis.

Otra investigación llevada a cabo empleando *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus* evaluaron el efecto de los ácidos orgánicos (ácido acético, láctico, propiónico y

fórmico) sobre el crecimiento de *E. coli* y *S. aureus* observando que el ácido fórmico presentó el mejor efecto antimicrobiano en ambas cepas (Raftari et al. 2009).

La actividad inhibitoria de los factores extracelulares producidas por las bacterias ácido lácticas (BAL) sobre algunos microorganismos de importancia médica han sido atribuidos a la presencia de diversos ácidos orgánicos, pero también a la presencia de bacteriocinas las cuales se caracterizan por ser compuestos de naturaleza peptídica o proteínas, sintetizados a partir de los ribosomas libres y que, generalmente, tienen como blanco la membrana celular (Jack et al. 1995 y Savadogo et al. 2006). Algunas de las propiedades fisicoquímicas que presentan las bacteriocinas son: resistencia a proteasas, son solubles en agua, activas a pH ácidos, bactericidas, termoresistente y no imparten sabor o aromas (Fernández et al. 2003) y además son termoestables (Dodd y Gasson 1994 y Ogunbanwo et al. 2003).

Por otra parte, se llevó a cabo un trabajo empleando el sobrenadante del cultivo de *Lactobacillus johnsonii* La1 sobre la proliferación *in vitro* de *Giardia intestinalis*, observando que el efecto del sobrenadante de *L. johnsonii* La1 inhibió significativamente la proliferación de los trofozoítos de *G. intestinalis*. Esta inhibición estuvo correlacionada fuertemente al pH (Pérez et al. 2001).

La mayoría de las investigaciones realizados han permitido determinar la actividad inhibitoria o interferencia microbiana que presentan los metabolitos liberados al medio (postbióticos) por parte de las bacterias consideradas como probióticos sobre bacterias de importancia médica, sin embargo pocos trabajos han evaluado dicha actividad sobre protozoarios de importancia médica, entre los parásitos sobre los cuales se han evaluado la actividad de los probióticos son: *Babesia microti*, *Cryptosporidium parvum*, *Eimeria tenella*, *G. lamblia*, *Plasmodium chabaudi*, *Schistosoma mansoni*, *Toxocara canis*, *Trichinella spiralis*, *Ascaris suum* y *Trypanosoma cruzi* (Travers et al. 2011).

Pero para *E. histolytica* existe escasos reporte, (Mansour et al. 2003) menciona que de la administracion del probiótico *Saccharomyes boulardi* en asociación con antibióticos disminuye significativa los síntomas de la amibiasis y la presencia de quistes en heces; en otro trabajo reportan un co-cultivo *in vitro* de *Entamoeba invadens* (modelo biológico para

el estudio de la amibiasis) en presencia de *Lactobacillus casei* and *Enterococcus faecium* observando la alteración del ciclo celular de *E. invadens* (Sarjapuram et al. 2017). En otro trabajo mencionan sobre la necesidad de la presencia de ciertas bacterias (no probióticos) al momento del desenquistamiento de *E. histolytica* para poder fagocitarlas, alimentarse y multiplicarse a nivel de intestino delgado (Varet et al. 2018) y tener éxito en el desarrollo de la amoebiasis.

En la búsqueda de alternativas terapéuticas para la amibiasis, recientemente se ha trabajado con las bacteriocinas, las cuales constituyen un grupo heterogéneo de péptidos que presentan una gran variedad de características fisicoquímicas y espectros de acción antimicrobiana. En el presente trabajo, los bioensayos realizados con el tratamiento de sinergia de bacteriocinas de *L. plantarum* + *L. casei* y la Nisina (bacteriocina comercial) mostraron mayor inhibición de trofozoítos que cuando se emplean los postbióticos liofilizados a dosis conocidas sobre los cultivos axénicos *in vitro*, la mayor inhibición se observó al emplear la sinergia de las bacteriocinas de *L. casei*+*L.plantarum* (Figura 12).

Sin embargo, en este trabajo consideramos importante diseñar una estructura que proteja a las bacteriocinas para que lleguen al sitio de acción, es decir intestino delgado (sitio de multiplicación de trofozoítos de *E. histolytica*) o para que lleguen hasta el colon (sitio de enquistamiento de *E. histolytica*) cuyo pH en estas regiones varía desde 6.5 hasta 8.5, por eso consideramos importante el diseño de microcapsulas y capsulas que permitan el acarreo y les brinden protección a estas bacteriocinas para que puedan actuar en el sitio específico o deseado. Existen una gran variedad de métodos para encapsular bacteriocinas, sin embargo en los resultados obtenidos decidimos trabajar sólo con las bacteriocinas encapsuladas en alginato de sodio, ya que no alteran el rendimiento celular de *E. histolytica* (Figura 18) y no nos daría en nuestras evaluaciones falsos positivos, además el alginato de sodio está considerado como grado alimenticio (GRAS). Hasta la fecha, las bacteriocinas han exhibido una prometedora alternativa como antimicrobiano tanto para la industria alimenticia como farmacéutica. Además, durante en las últimas dos décadas, la encapsulación de bacteriocinas ha significado una mejora en las aplicaciones de estos antimicrobianos naturales, los cuales proporcionaría alternativas convenientes para el bienestar humano sin presentar efectos secundarios indeseables, sin embargo se deberán

realizar una mayor cantidad de estudios muy cuidadosos que permitan prevenir la resistencia de los patógenos a las bacteriocinas.

Uno de los péptidos mejor caracterizados y que se encuentra en la categoría Generalmente Reconocidas como Seguras (GRAS) es la nisina, la cual ha sido evaluada su actividad antibacteriana y antimicótica, la nisina es un péptido antibacteriano de 34 aminoácidos producido por ciertas cepas de *Lactococcus lactis*. Esta bacteriocina ha encontrado una amplia aplicación como conservante de alimentos debido a su naturaleza no tóxica, su estabilidad térmica a pH ácido, su inactivación por enzimas proteolíticas en el tracto digestivo y, especialmente, su actividad antimicrobiana contra una amplia gama de bacterias Gram-positivos, incluidos los patógenos de interés en la industria alimentaria, como *Clostridium botulinum* y *Listeria monocytogenes*, *staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella spp* (Wu et al. 2004; Jeevaratnam et al. 2005).

Sin embargo, el uso de nisina tiene la limitación de que su solubilidad y estabilidad disminuyen progresivamente a medida que aumenta el pH de su entorno. Las dos variantes naturales de la nisina, denominadas nisina A y nisina Z, se sintetizan ribosómicamente como 57 péptidos precursores de aminoácidos que se someten a modificaciones adicionales. El péptido maduro muestra varias características inusuales, como la presencia de aminoácidos deshidratados y anillos de lantionina. La inserción del péptido en la membrana citoplasmática de las células susceptibles conduce a la formación de poros, disipando el potencial de membrana y los gradientes de pH (Rodríguez 1996).

De acuerdo a la literatura, la actividad bactericida de las bacteriocinas puede estar acompañada por lisis de células, como es el caso de la nisina A, la cual actúa desestabilizando o permeabilizando la membrana citoplasmática (Varo 2010), como se muestra en la Figura 28.

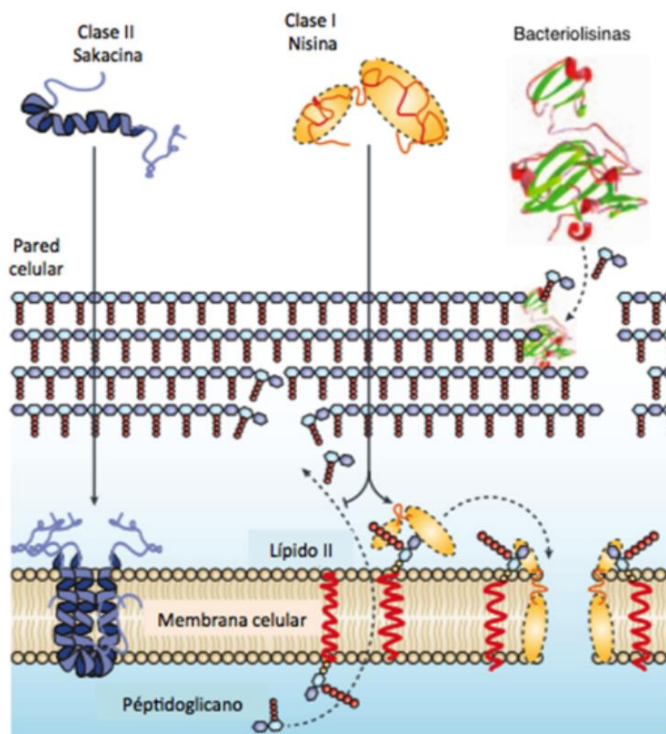


Figura 28. Mecanismo de acción de la nisina (Adaptado de Cotter et al. 2005).

Por otra parte, en función a la capacidad de inhibición por parte de las bacteriocinas se procedió a la caracterización bioquímica parcial de las mismas, obteniendo en el análisis electroforético de los liofilizados de bacteriocinas un peso molecular de las proteínas de aproximadamente 10 kDa (Datos no mostrados).

Las bacteriocinas obtenidas a partir de los posbióticos obtenidos de *L. casei* y *L. plantarum* fueron encapsuladas bajo condiciones para que la liberación se realizara a partir de pH 7 y lograra llegar hasta pH 8, estas bacteriocinas se encapsularon y se colocaron directamente en los cultivos de *E. histolytica*, la sinergia de estas bacteriocinas mostró una inhibición de 48% de *E. histolytica*. En la actualidad se han reportado compuestos proteicos obtenidos a partir de probióticos, también se encapsularon bajo las mismas condiciones diversos agentes como nisina, drogas antiamebianas como el metronidazol y albendazol observando una inhibición de *E. histolytica* del 74 % para nisina y metronidazol y albendazol inhibió un 73.72% respectivamente, entre estos tres agentes evaluados no se observa diferencia significativa, pero si con respecto a la sinergia de bacteriocinas (Figura 24).

Esto nos puede indicar que la liberación de bacteriocinas está limitada por la consistencia de la formulación de la capsula, por lo cual se recomendaría evaluar otros agentes o polímeros para la elaboración de las capsulas, sin embargo es un avance importante, ya que será posible dirigir capsulas conteniendo bacteriocinas, para que liberen su mayor concentración al pH deseado, o bien diseñar liposomas, nanotubos cargados con las bacteriocinas o diseño de nanofibras, tal como se recomienda en diversos estudios referentes al tema (Chandrakasan et al. 2019; y Ngoc et al. 2019).

Tradicionalmente, para observar diversas características típicas de los estadios de trofozoíto o quiste se emplean diversas tinciones específicas y para realizar las observaciones de dicho material biológico, se emplea el microscopio óptico o bien microscopio de fluorescencia; en el caso de observar la estructura interna se ha empleado principalmente el microscopio electrónico de transmisión y para realizar la observación topológica de la célula se emplea el microscopio de barrido (León, 2012). Sin embargo, en la actualidad se pueden realizar análisis de espectrometría de dichas células empleando nuevas herramientas microscópicas, como el microscopio de fuerza atómica MFA/AFM (Ortega et al. 2014).

Por otra parte, los resultados obtenidos del análisis que se realizó mediante MFA mostraron que la morfología de los trofozoítos de *E. histolytica* control (cultivo axénico *in vitro*) y trofozoítos obtenidos de un cultivo en presencia de las bacteriocinas (sinergia de *L. casei* + *L. plantarum*), presentan modificaciones en cuanto a la rugosidad de la membrana celular, altura, ancho y longitud del trofozoíto, los valores de cada uno de los parámetros analizados se observan en la Tabla 2 y Figura 25 tienen diferente tamaño y altura con respecto a células cultivadas en tratamiento. Un aspecto importante que se observó es que el tratamiento con bacteriocinas induce mayor rugosidad, mayor altura, con respecto al trofozoíto control, pero presentan menor ancho y menor longitud con respecto al aspecto del trofozoíto control (Figura 25), la imagen en 3D que se obtuvo de ambos trofozoítos (control y tratamiento) se observan en la Figura 26a y b, el trofozoíto cultivado en la presencia de la sinergia de bacteriocinas perdió su aspecto pleomorfo, adquiriendo un aspecto redondeado, aspecto típico de células en mal estado y que en los cultivos tienden a hacerse esféricos (Figura 26b) y a desprenderse, lo cual nos indica alteración a nivel de

citoesqueleto y probablemente a nivel de síntesis de proteínas por parte de los ribosomas citoplásmicos, y que probablemente la alteración en la síntesis de proteínas afecte la síntesis de la actina-F o actina-G y otras proteínas involucradas en el desplazamiento celular, es decir son células incapaces para adherirse a la base, formar pseudópodos, adherirse a la superficie, así como realizar procesos de micropinocitosis posiblemente debido a la incapacidad de poder producir las proteínas de la familia ARP (Proteínas Relacionadas a la Actina) cuyo peso molecular oscila de 16 a 44 kDa (Manich et al. 2018), en las proteínas obtenidas del trofozoíto control se observan gran cantidad de bandas de proteínas en este rango, sin embargo en las proteínas obtenidas del trofozoíto cultivado en presencia de bacteriocinas (sinergia de *L. casei* y *L. plantarum*) se observan muy escasas bandas de proteínas, llegando a no observar bandas menores a 31 kDa y escasas bandas en el rango de 35 a 45 kDa (Figura 28); entre otras proteínas que pueden sufrir alteraciones pueden ser las cisteín proteasas (proteínas encargadas del proceso de lisis a nivel de membrana) tratados o la adhesina proteína de 112 kDa, y este bandeo también se ve alterado en los trofozoítos.

Con respecto a la relación citoesqueleto-probióticos, existen diversos reportes en los cuales mencionan el incremento en la estabilidad de las uniones celulares debido a que los probióticos incrementan la expresión de las proteínas componentes de las uniones celulares, tales como la Claudina-1, ocludinas, zonula-occludens 1 (ZO-1) y moléculas de adhesión (JAM-1) (Karczewski et al. 2010; Mennigen et al. 2009; Yang et al. 2015 and Zyrek et al. 2007. Otro estudio ha demostrado que el sobrenadante libre de células (postbióticos) de *Bifidobacterium lactis* (420) incrementa la integridad de las uniones estrechas de las células de epitelio intestinal y las protege contra *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) 0157:H7 y de sus derivados celulares (Putala et al. 2008). Por otra parte, también se han estudiado proteínas secretadas por LGG las cuales han demostrado protección a células de epitelio intestinal por daño inducido por H₂O₂ por la vía de las quinasas (Seth et al. 2008). En otro reporte indican que células de CaCo-2 pretratadas con una monocapa de *L. plantarum* atenuada con esters de forbol induce dislocación del ZO-1 y de las ocludinas de las uniones intercelulares (Karczewski et al. 2010).

Existe un estudio reciente que involucra Microscopía Electrónica, de Fuerza Atómica y Confocal donde compararon el proceso de adhesión de *E. histolytica* y *E. dispar* a fibronectina. Los resultados mostraron que la adhesión de *E. histolytica* a fibronectina involucra una reorganización de la red de actina que resulta en el contacto y degradación focal de matriz celular de la fibronectina. En contraste con *E. dispar* que no mostró estas regiones de adhesión focal. Además el análisis de MFA mostró diferencias en el sitio de contacto de ambas amibas con el sustrato. Estos resultados mostraron que existen diferencias entre los procesos de adhesión de ambas especies, lo cual es relevante para el entendimiento del carácter invasivo de *E. histolytica* (Talamás et al. 2015).

De acuerdo a los resultados obtenidos, sería de interés identificar cuales bacteriocinas están involucradas en la alteración de las síntesis de proteínas en los trofozoitos tratados con la sinergia de bacteriocinas de *L. casei* y *L. plantarum*, ya que la alteración que se induce en ellas representa daños que involucran la viabilidad del trofozoito control, ya que al no producir la adhesina ya no tendrá la capacidad para adherirse a las células del epitelio intestinal y provocar la lisis del tejido y por consiguiente se podría alterar o frenar capacidad para invadir otros tejidos del huésped.

Los resultados presentados en este trabajo, nos permiten considerar el uso de bacteriocinas como una alternativa terapéutica contra la amibiasis y así mismo, disminuir el consumo de metronidazol y derivados imidazólicos, los cual genera efectos secundarios indeseables en los pacientes.

10. CONCLUSIONES

- Los postbióticos derivados de *L. casei* y *L. plantarum* presentan actividad inhibitoria sobre el cultivo axénico *in vitro* de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS.
- La sinergia de las bacteriocinas obtenidas de *L. casei* y *L. plantarum* a una concentración de 1 mg/mL presentan actividad inhibitoria sobre el cultivo axénico *in vitro* de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS.
- El diseño de capsulas por goteo de alginato de sodio [2%] y gelificación en cloruro de calcio conteniendo la sinergia de bacteriocinas de *L. casei* + *L. plantarum* permite su liberación a pH=7.
- El lantibiótico nisina presentó actividad anti*amibiana* significativa, evaluado tanto directamente sobre el cultivo o bien encapsulado.
- La microscopía de fuerza atómica es una herramienta eficiente que aporta valiosa información acerca de las alteraciones celulares que son provocadas por las bacteriocinas sobre el trofozoíto de *E. histolytica* HM1-IMSS.

11. PERSPECTIVAS

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se recomienda continuar con estudios que traten sobre los siguientes tópicos.

- Como el tratamiento con las sinergias de bacteriocinas resultó con mayores porcentajes de inhibición, es recomendable seguir el análisis de la mezcla de las bacteriocinas para obtener una mejor caracterización bioquímica de éstas.
- Es importante conocer que actividad biológica presentan en los trofozoítos las proteínas inhibidas debido a la sinergia de las bacteriocinas de *L. casei* + *L. plantarum*.
- Se recomienda evaluar la sinergia de las bacteriocinas de *L. casei* + *L. plantarum* en el proceso de enquistamiento de *E. histolytica* HM1-IMSS.
- Se recomienda conocer la secuencia de las bacteriocinas responsables de la actividad anti*amibiana*, y por medio de ingeniería molecular clonarlas en un modelo biológico para obtener la mayor cantidad posible de dichas bacteriocinas.
- Desarrollar métodos de encapsulamiento de bacteriocinas que permitan ser dosificadas al grupo objetivo.
- Evaluar el uso potencial de las bacteriocinas encapsuladas en el campo de la veterinaria.
- Por otra parte, se recomienda hacer una búsqueda de potencial anti*amibiano* de posibles postbióticos de bacterias ácido lácticas de cepas de probióticos de México.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Agudelo N, Torres M, Alvarez C, Vélez L. 2015. Bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas y su aplicación en la industria de alimentos. *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencia y Tecnología de Alimentos* 23(36):186-205.
- Aguilar-Toalá, J. E., García-Varela, R., García, H. S., Mata-Haro, V., González-Córdova, A. F., Vallejo-Córdova, B., & HernándezMendoza, A. 2018. Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. *Trends in Food Science & Technology* 75:105-114. doi: 10.1016/j.tifs.2018.03.009
- Amores R, Calvo A, Maestre JR, Martínez D. 2004. Prebióticos. *Revista Española de Quimioterapia* 17 (2): 131-139.
- Anselmo, A. C., McHugh, K. J., Webster, J., Langer, R., & Jaklenec, A. 2016. Layer-by-Layer encapsulation of probiotics for delivery to the microbiome. *Advanced materials* 28(43):9486–9490. doi:10.1002/adma.201603270
- Barrón-González MP, Villareal-Treviño L, Reséndez-Pérez D, Mata-Cárdenas BD, Morales-Vallarta MR. 2008. *Entamoeba histolytica*: Cyst-like structures *in vitro* induction. *Experimental Parasitology* 118: 600–603.
- Cavalier T. 1998. A revised six-kingdom system of life. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 73(3):203-266.
- Centers for Disease Control and Prevention. DPDx - Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern. <https://www.cdc.gov/dpdx/amebiasis/index.html>. Accessed 03 octubre 2019
- Chandrakasan, Gobinath, Rodríguez Hernández, Adriana, López-Cuellar, Ma Del Rocio, Palma, Heidi and Chavarría-Hernández, Norberto. 2019. Bacteriocin encapsulation for food and pharmaceutical applications: advances in the past 20 years. *Biotechnology Letters*. 41. 10.1007/s10529-018-02635-5.

- Cicenia A, Santangelo F, Gambardella L, Pallotta L, Iebba V, Scirocco A, Severi, C. 2016. Protective role of postbiotic mediators secreted by *Lactobacillus rhamnosus* GG versus Lipopolysaccharide-induced damage in human colonic smooth muscle cells. *Journal of Clinical Gastroenterology* 50:S140-S144. doi: 10.1097/MCG.0000000000000681
- Cotter PD., Hill, C. and Roos, R.P. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology* 3(10):777-788.
- Cruz PK. 2007. Inmovilización celular por atrapamiento, como vehículo de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* bajo condiciones gastrointestinales humanas *in vitro*. UPIBI-IPN, México.
- Cuellar F. 2015. Actividad biológica de bacteriocinas sobre el enquistamiento de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS y características nanomecánicas de la superficie celular al microscopio de fuerza atómica. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas. Tesis de Maestría.
- Dodd HM, Gasson MJ (1994) Bacteriocins of lactic acid bacteria. In: *Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria* (ed) M. J. Gasson and W. M. de vos Blackie. Academic and Professional, an Imprint of Chapman and Hall, Glasgow, U.K, pp 211-251.
- Durán-Páramo, E. 1997. Etude du comportement physiologique de *Bacillus subtilis* ATCC-21556 confiné et en suspension: suivi des métabolites et d'activités enzymatiques endo et exocellulaires. Tesis de doctorado. Université de Technologie de Compiègne, Francia.
- Falagas, M. E., Rafailidis, P., & Makris, GC. 2008. Bacterial interference for the prevention and treatment of infections. *International Journal of Antimicrobial Agents* 31(6):518-522. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2008.01.024

- FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002. http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf (accesado el 22 de junio de 2018).
- Fernández M, Boris S, Barbés C. 2003. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology* 94(3):449-455. <https://doi:10.1046/j.1365-2672.2003.01850.x>
- Fijan, S. 2014. Microorganisms with claimed probiotic properties: An overview of recent literature. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(5):4745-4767. doi: 10.3390/ijerph110504745
- Finney DJ. 1952. Probit Analysis. Cambridge, England, Cambridge University Press. USA.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations World Health Organization. 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a joint FAO/WHO Working Group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002. Recuperado el 10 de marzo de 2019, de http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf
- Frantz S, Vincent K.A. Feron O., Kelly RA. 2005. Innate immunity and angiogenesis. *Circulation Research* 96:15-26. DOI: 0.1161/01.RES.0000153188.68898.ac
- Ganz, T. 2004. Defensins: antimicrobial peptides of vertebrates. *Comptes Rendus Biologies* 6:539-549.
- Germano F, Bramanti E, Arcuri C, Cecchetti F, Cicciú M. 2013. Atomic force microscopy of bacteria from periodontal subgingival biofilm: preliminary study results. *European Journal of Dentistry* 7:152-158.
- Gómez, J.; Cortés, J.; Cuervo, S.; López, M. 2007. Amebiasis intestinal. *Asociación colombiana de infectología. Infectio* 11(1): 36-45.

- González R, Bernal R, Melo F. 2003. Caracterización de membranas de PDMS para el estudio de fuerzas de adhesión celular. Laboratorio de Física no Lineal, Departamento de Física, Universidad de Santiago de Chile.
- González, M; Carabarin, A; Baylon, L and Rosales, J. 2012. De amibas y amebiasis: *Entamoeba histolytica*. Elementos 87:13-18.
- Gutiérrez G, Muñoz O. 1994. Epidemiología de la amibiasis. Kretschmer R, (ed) Amibiasis, infección y enfermedad por *Entamoeba histolytica*. Editorial Trillas. México, pp. 389-397.
- Gutiérrez M. 2008. Amebiasis en España: diagnóstico molecular y estudio epidemiológico de una parasitosis emergente. ISBN: 978-84-692-0156-5. Tesis. Universidad complutense de Madrid.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C. and Sanders, M.E. 2014. Expert Consensus Document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics Consensus Statement on the Scope and Appropriate Use of the Term Probiotic. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology 11:506-514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI).2006-2008. Banco de información INEGI. [Online]Disponible en: <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/biinegi/>
- Jack RW, Tagg JR, Ray B. 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. Microbiological Reviews 59(2):171-200. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC239359/pdf/590171.pdf>
- Jaramillo D, Meléndez A, Sánchez O. 2010. Evaluación de la producción de bacteriocinas a partir de Lactobacilos y Bifidobacterias. Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos 1(2):193-209.
- Jeevaratnam K., Jamuna M. y Bawa AS. 2005 Biological preservation of foods- bacteriocins of lactic acid bacteria. Indian Journal of Biotechnology 4:446-454

- Joshi N, Medina H, Barboza J. 2000. Estructura nanoimaging y ultra de *Entamoeba histolytica* y sus pseudópodos mediante microscopio de fuerza atómica. Escaneado y microscopías de fuerza para aplicaciones biomédicas II. In: Nie S, Tamiya E, Yeung ES (eds). Proceedings of SPIE. 3922:222-227.
- Karczewski J., F. J. Troost, I. Konings, J. Dekker, M. Kleerebezem, R. J. Brummer and J. M. Wells. 2010. Regulation of human epithelial tight junction proteins by *Lactobacillus plantarum* in vivo and protective effects on the epithelial barrier, American Journal of Physiology Gastrointestinal-Liver Physiology 298, G851–G859. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2018/fo/c8fo00376a> (accesado 18-oct-19).
- Karnik R, F. Gu, P. Basto, C. Cannizzaro, L. Dean, W. Kyei, Manu, R.Langer, O.C. Farokhzad. 2008. Microfluidic platform for controlled synthesis of polymeric nanoparticles. Nano Letter 8:2906-2912
- Kazakova L.I. and Shabarchina L.I. 2011. Journal of Physic Chemistry. 13: 110-111.
- Koczulla, A.R.; Bals, R. 2003. Antimicrobial peptides: current status and therapeutic potential. Drugs 63: 389-406.
- Lee YK, Salminen S. 1995. The coming of age of probiotics. Trends in Food Science & Technology 6: 241–245.
- León A. 2012. Morfogénesis de la pared celular y propiedades biofísicas de *Entamoeba histolytica* durante su diferenciación. Universidad Autónoma de Nuevo León. Tesis de Maestría.
- Leroux JC, Allemann E, De Jaeghere F, Ducloux E, Gurny R. 1996. Biodegradable nanoparticles—From sustained release formulation to improved site specific drug delivery. Journal of Control Release 30:339 – 50.
- Madene A., Jacquot M., Sher J. 2006. International Journal of Food Science Technology, 41:1.

- Manich Maria, Hernandez-Cuevas Nora, Ospina-Villa Juan D., Syan Sylvie, Marchat Laurence A., Olivo-Marin Jean-Christophe, Guillén Nancy. 2018. Morphodynamics of the Actin-Rich Cytoskeleton in *Entamoeba histolytica*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 8:179-DOI=10.3389/fcimb.2018. ISSN=2235-2988.
- Mansour F, Dehbashi N, Yazdanparast K, Shafaghi A. 2003. Efficacy of *Saccharomyces boulardii* with antibiotics in acute amoebiasis *World J Gastroenterol* 9(8):1832–1833. <https://doi.org/10.3748/wjg.v9.i8.1832>
- Martínez A. 1987. Las amibas, enemigos invisibles. Fondo de Cultura Económica, SEP. México, D.F. ISBN 968-16-2713-X, [Online]. [http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen1/ciencia2/47/html/ami](http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen1/ciencia2/47/html/ami%20ba) ba
- Martínez I. 2014. Actividad biológica *in vitro* de cuatro tratamientos sobre *Helicobacter pylori* y análisis morfométrico al microscopio de fuerza atómica. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas. Tesis de Licenciatura.
- Menchaca J, Barrón M, León A, Ortega J, Vargas J, Hernández J, Morales M. 2014. *Entamoeba histolytica*: trophozoite, precyst and cyst studied by atomic force microscopy. *Microscopy: advances in scientific research and education* (A. Méndez-Vilas, Ed.) 1:153-160.
- Mennigen R., K. Nolte, E. Rijcken, M. Utech, B. Loeffler, N. Senninger and M. Bruewer, Probiotic mixture VSL#3. 2009. Protects the epithelial barrier by maintaining tight junction protein expression and preventing apoptosis in a murine model of colitis, *Am. J. Physiol.: Gastrointest. Liver Physiol* 296, G1140–G1149. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2018/fo/c8fo00376a> (accesado 18-oct-19).
- Murray PR, Rosenthal KS, Pfäuer MA. 2007. Microbiología médica. Elsevier Imprint. Iowa, City, USA. ISBN: 978-84-8174-927-4.

- Nahuelquín Y. 2008. Aplicación de una combinación de bacteriocinas bioencapsuladas, como higienizante de superficies de acero inoxidable. Universidad Austral de Chile. Escuela de ingeniería en alimentos. Tesis.
- Ngoc Thuy TL, Long GB, Duy Chinh N., Tran Hong XL, Khanh Hung P, Dai Hai N. and Thai Thanh HT. 2019. Evaluation of factors affecting antimicrobial activity of bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* microencapsulated in alginate-gelatin capsules and its application on pork meat as a bio-preservative. *Environmental Research and Public Health* 16(6): 1017.
- Ogunbanwo ST, Sanni AI, Onilude AA. 2003. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. *African Journal of Biotechnology* 2(8):219–227.
- Ortega JE, Barrón-González MP, Gracia-Pinilla MA, Pérez E, López-Aldrete A, Menchaca J-L. 2014. Biological samples observed in vitro by Atomic Force Microscopy: Morphology and Elastic Properties. In: Méndez-Vilas A, editor. *Microscopy: advances in scientific research and education*. Badajoz: Formatex Research Center.
- Ozgur S, Sergei M, Chanmin S, Calvin F, Olav S. 2007. An atomic force microscope tip designed to measure time-varying nanomechanical forces. *Nature Nanotechnology* 2:507-514.
- Pérez, P. F., Minnaard, J., Rouvet, M., Knabenhans, C., Brassart, D., De Antoni, G. L., & Schiffrin, EJ. 2001. Inhibition of *Giardia intestinalis* by extracellular factors from *Lactobacilli*: An in vitro Study. *Applied and Environmental Microbiology* 67(11):5037-5042. doi: 10.1128/AEM.67.11.5037-5042.2001
- Poe S.L. and Kobaslija M. 2007. Mechanism and application of a microcapsule enabled multicatalyst reaction. *Journal of the American Chemical Society* 129(29): 9216-9221.

- Putaalaa H, T. Salusjarvi, M. Nordstrom, M. Saarinen, A. C. Ouwehand, E. Bech Hansen and N. Rautonen. 2008. Effect of four probiotic strains and *Escherichia coli* O157:H7 on tight junction integrity and cyclo-oxygenase expression, Research Microbiology 159, 692–698. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2018/fo/c8fo00376a> (accesado 18-oct-19).
- Raftari M, Jalilian FA, Abdulamir A, Son R, Sekawi Z, Fatimah A. 2009. Effect of Organic Acids on *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* Contaminated Meat. Open Microbiology Journal 3:121-127. <https://doi.org/10.2174/1874285800903010121>
- Reddy, K.V.; Yedery, R.D.; Aranha, C. 2004. Antimicrobial peptides: premises and promises. International Journal of Antimicrobial Agents 6:536-547.
- Ríos J.; Mercadillo P.; Yuil E.; Ríos M. 2012. Amebiasis cutánea: Conceptos actuales. Cutaneous amebiasis: Current concepts. Revista de Medicina del Hospital General de México 75(2):114-122
- Rishi P, Preet S, Kaur P. 2011. Effect of *L. plantarum* cell-free extract and co-trimoxazole against *Salmonella typhimurium*: a possible adjunct therapy. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials 10:9 <https://doi.org/10.1186/1476-0711-10-9>
- Rivas-Santiago, Bruno & Patricia, Vieyra & Fernández de Larrea, Carlos & Araujo, Zaida. 2006. Células Epiteliales en la inmunidad del pulmón. Kasmera 34(1): 61-68.
- Rodríguez J.M. 1996. Antimicrobial spectrum, structure, properties and mode of action of nisin, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis*. Food Science and Technology International 2 (2):61-68. <https://doi.org/10.1177/108201329600200202> (accesado 17 octubre 2019).

- Sang-Ho Yoo, Young-Bin Song, Pahn-Shick Chang, Hyeon Gyu Lee. 2006. Microencapsulation of α -tocopherol using sodium alginate and its controlled release properties, *International Journal of Biological Macromolecules* 38(1):25-30. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2005.12.013>.
- Sarjapuram N, Mekala N, Singh M, Tatu U. 2017. The potential of *Lactobacillus casei* and *Enterococcus faecium* combination as a preventive probiotic against *Entamoeba*. *Probiotics Antimicrob Proteins* 9:142–149. <https://doi:10.1007/s12602-016-9232-z>
- Savadogo A, Ouattara CAT, Bassole IHN, Traor SA. 2006. Bacteriocins and lactic acid bacteria- a minireview. *African Journal of Biotechnology* 5(9):678–683.
- Sehgal D., Bhattacharya A., Bhattacharya S. 1996. Pathogenesis of infection by *Entamoeba histolytica*. *Journal of Bioscience* 21(3):423 – 432.
- Seth A, F. Yan, D. B. Polk and R. K. Rao. 2008. Probiotics ameliorate the hydrogen peroxide-induced epithelial barrier disruption by a PKC- and MAP kinase-dependent mechanism, *American Journal of Physiology and Gastrointestinal-Liver Physiology* 294: G1060–G1069. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2018/fo/c8fo00376a> (accesado 18-oct-19).
- Sheng J. 2010. *Modern Chemical Enhanced Oil Recovery: Theory and Practice*. Gulf Professional Publishing. Texas Tech University, USA.
- Shennan A, Crawshaw S, Briley A, Hawken J, Seed P, Jones G., Poston L. 2006. A randomised controlled trial of metronidazole for the prevention of preterm birth in women positive for cervicovaginal fetal fibronectin: the PREMETS Study. *BJOG An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 113 (1): 65-74.

- Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), Secretaría de Salud. 2019. Boletín Epidemiológico/Dirección General de Epidemiología, 4(36):16-19. <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/501186/sem40.pdf> (accesado 19-oct-2019)
- Talamás-Lara, D., Talamás-Rohana, P., Fragoso-Soriano, R. J., Espinosa-Cantellano, M., Chávez-Mungía, B., González-Robles, A., Martínez-Palomo, A. 2015. Cell-matrix interactions of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*. A comparative study by electron-, atomic force- and confocal microscopy. Experimental Cell Research, 337(2), 226-33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.07.030>
- Tanyuksel, M. y Petri, W.A. 2003. Laboratory Diagnosis of Amebiasis. Clin Microbiol Rev. 16(4):713-729
- Travers, Marie-Agnès & Florent, Isabelle & Kohl, Linda & Grellier, Philippe. 2011. Probiotics for the Control of Parasites: An Overview. Journal of parasitology research. 2011. 610769. 10.1155/2011/610769.
- Trejos Suárez, J.; Castaño Osorio, J. 2009. Factores de virulencia del patógeno intestinal *Entamoeba histolytica*. Infectology. 13(2):100-110.
- Tsilingiri, K., & Rescigno, M. 2013. Postbiotics: What else? Beneficial Microbes 4(1): 101-107. doi: 10.3920/BM2012.0046
- Varet H, Shaulov Y, Sismeiro O, Trebicz M, Legendre R, Coppée JY, Ankri S, Guillen N. 2018. Enteric bacteria boost defences against oxidative stress in *Entamoeba histolytica*. Scientific Reports 8(1):9042. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27086-w>.
- Varo B. 2010. Caracterización parcial de bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas aisladas de hortalizas. Instituto Politécnico Nacional. México, Distrito Federal. Tesis de Doctorado. <https://tesis.ipn.mx/jspui/handle/123456789/7269>.

- Villalba-Magdaleno J., Pérez-Ishiwara G., Serrano-Luna J., Tsutsumi V. and Shibayama M. 2011. In vivo programmed cell death of *Entamoeba histolytica* trophozoites in a hamster model of amoebic liver abscess. *Microbiology* 157:1489-99. 10.1099/mic.0.047183-0.
- Walsh A. 1986. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis. Stimulation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Revista Clinical Infectious Diseases* 8:228.
- Weitz D. 2014. 25th Anniversary Article: Double Emulsion Templated Solid Microcapsules: Mechanics And Controlled Release. *Advanced Materials* 5:119.
- World Health Organization (WHO). 2017. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Recuperado el 10 de marzo de 2018, de <http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>
- Wu, CW., Yin LJ. Y Jiang ST. 2004. Purification and characterization of bacteriocins from *Pediococcus pentosaceus* ACCEL. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*.52:1146-1151.
- Yang F., A. Wang, X. Zeng, C. Hou, H. Liu and S. Qiao. 2015. *Lactobacillus reuteri* I5007 modulates tight junction protein expression in IPEC-J2 cells with LPS stimulation and in newborn piglets under normal conditions, *BMC Microbiology* 15:32. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4350629/> (accesado 18-oct-19).
- Zyrek AA., C. Cichon, S. Helms, C. Enders, U. Sonnenborn and M. A. Schmidt. 2007. Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of *Escherichia coli* Nissle 1917 involve ZO-2 and PKC ζ redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair, *Cellular Microbiology* 9:804–816. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2018/fo/c8fo00376a> (accesado 18-oct-19).

RESUMEN BIOGRÁFICO

M.C. Fabiola Lizeth Cuellar Guevara

**Candidato para el Grado de
Doctor en Ciencias con Orientación en Microbiología**

Tesis: Inhibición de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS con encapsulados de liberación controlada de bacteriocinas y caracterización al MFA.

Campo de estudio: Ciencias Biológicas, Parasitología, Microbiología.

Formación académica

- Maestra en Ciencias con Especialidad en Microbiología, por la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Licenciado en Biólogo por la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.

Publicaciones derivadas de la Tesis de Doctorado:

- **Fabiola L. Cuellar Guevara**, María P. Barrón González, Jorge L. Menchaca Arredondo. (2019). Effect of lactobacillus postbiotics on *Entamoeba histolytica* trophozoites, Revista de Investigación Clínica/ Clinical and Traslational Investigation. 71:397-402. En Prensa. ISSN: 0034-8376. eISSN: 2564-8896. DOI: 10.24875/RIC.19003026. FI: 1.513
- Montes-de-Oca, L., **Cuellar, F.**, Rodriguez-Nieto, M., Rodríguez-López, R., Espinoza, S., Espinosa, G., Barrón M., Menchaca, J. (2018). Micro-Encapsulation of Probiotic Metabolites and Magnetic Nanoparticles Inside Liposomes using Microfluidic Devices. Microscopy and Microanalysis, 24(S1), 1430-1431. doi:10.1017/S1431927618007638., ISSN 1431-9276 (print) / 1,435-8115 (web). FI: 2.673.
- Barrón-González, MP., Mireles-Rangel, C., **Cuéllar-Guevara, F. L.**, Eguiarte-Lara, D. J., & Quiñones-Gutiérrez, Y. (2019). Inhibición de *Enterobacter cloacae* por *Bifidobacterium longum*. Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, 27(77), 19-26. ISSN. 1665-4412, e-ISNN 2521-9758.

Estancia Nacional de Investigación durante el Doctorado

Estancia en el Laboratorio del Instituto de Física y Matemáticas (UMSNH) - Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia Michoacán, la estancia se realizó en agosto de 2018, bajo la recepción del Dr. Gabriel Espinosa Pérez. Durante esta estancia participó en el desarrollo del diseño de microencapsulación capa-sobre-capas.

Experiencia profesional:

- Participante en 12 congresos nacionales e internacionales, durante el periodo como estudiante de doctorado, participando con ponencias en póster y orales.